Michael Stegherr

PROINSULINBESTIMMUNG IM SERUM UND SEINE KLINISCHE BEDEUTUNG

Diss. München
1983

Univ.
Library
Iowa

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

PROINSULINBESTIMMUNG IM SERUM UND SEINE KLINISCHE BEDEUTUNG

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Michael Stegherr
aus Glött

1983

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Landgraf
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

M E I N E N E L T E R N

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Proinsulin im Serum	1
1.2.	Eigenschaften des Proinsulins	3
1.3.	Bestimmungsmethoden	5
1.4.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	7
2.	METHODE	8
2.1.	Material	8
2.2.	Säulenchromatographische Trennung von Insulin und Proinsulin	9
2.2.1.	Bio-Gel P-30-Elution mit 30 M Essigsäure	9
2.2.2.	Sephadex G-50 Superfine Elution mit 1 M Essigsäure	11
2.2.3.	Bio-Gel P-30 Elution mit Boratpuffer I	11
2.2.4.	Sephadex G-50 Superfine Elution mit Boratpuffer II	12
2.2.5.	Veränderung der Säulendimensionen	13
2.2.6.	Identifizierung der eluierten Peaks	15
2.2.7.	Rechromatographie	16
2.2.8.	Chromatographie von Serum	17
2.3.	Konzentrierung	19
2.3.1.	Konzentrierung des sich im Serum befindlichen Proinsulins und Insulins	20
2.3.1.1.	Extraktion mit saurem Alkohol	20
2.3.1.2.	Extraktion nach Alkoholpräzipitation	20
2.3.1.3.	Molekularfiltration	22
2.3.2.	Konzentrierung des im eluierten Puffer sich befindenden Proinsulins	24
2.3.2.1.	Molekularfiltration	24

Seite

2.3.2.2.	Dialyse	24
2.3.2.3.	Eindampfen des Eluates bei Raumtemperatur	25
2.3.2.3.1.	Insulin und Proinsulin in Essigsäure	25
2.3.2.3.2.	Insulin und Proinsulin in Boratpuffer	26
2.3.2.4.	Gefriertrocknung	27
2.4.	Radioimmunologische Bestimmungsmethoden von Insulin und Proinsulin	28
2.4.1.	Radioimmunologische Bestimmung des gesamten immunoreaktiven Insulins (IRI) im Serum	28
2.4.2.	Radioimmunologische Bestimmung von Insulin in Elutionspuffer nach Säulenchromatographie	29
2.4.3.	Radioimmunologische Bestimmung von Proinsulin in Elutionspuffer nach Säulenchromatographie	31
2.5.	Radioimmunologische Bestimmung von hGH in Serum	34
2.6.	Oraler Glucosetoleranztest	35
2.7.	Glucosebestimmung	35
2.8.	Statistische Auswertung	35
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Normalkollektiv	36
3.2.	Adipositas	36
3.3.	Akromegalie	39
3.4.	Insulinom	39
3.5.	Inselzellcarcinom	41
4.	DISKUSSION	43
4.1.	Proinsulinbestimmung in Serum	43
4.2.	Bestimmung der basalen und durch orale Glucose stimulierten Insulin- und Proinsulinwerte bei Patientenkollektiven	47

Seite

4.3. Wert der Proinsulinbestimmung im Serum bezüglich Diagnostik eines Insulinoms respektive eines Inselzellcarcinoms 51

5. ZUSAMMENFASSUNG 53

6. LITERATURVERZEICHNIS 55

1. EINLEITUNG

1.1. Proinsulin im Serum

BANTING und BEST (1) isolierten 1921 Insulin als blutzuckersenkende Substanz aus Pankreasextrakten. Weitere Jahre vergingen, bis STEINER (2) 1967 im Gewebe eines menschlichen Inselzell-Adenoms "Big-Insulin" (Proinsulin), die Vorstufe des Insulin fand. CHANCE und seinen Mitarbeitern (3) gelang es 1968, OYER (4) 1971, Proinsulin in reiner Form zu isolieren und die Aminosäuresequenz zu ermitteln.

YALOW und BERSON (5) beschrieben 1973 im Plasma eines Insulinpatienten eine weitere Substanz, genannt "Big, big Insulin" mit dem Molekulargewicht von ca. 100.000, die sich immunchemisch mit Humaninsulin identisch verhielt; durch Trypsin wurde sie rasch in insulinähnliche Komponenten gespalten. Ihr Anteil betrug bis zu 1 % des gesamten Insulins. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um eine Vorstufe von Proinsulin, eventuell um Konglomerate von Proinsulinmolekülen.

Proinsulin wird in den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Reticulums synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert. In den sich ausbildenden Sekretgranula erfolgt die Konversion des größten Teils des Proinsulins zu Insulin durch Abspaltung des sogenannten C-Peptids mittels einer trypsinähnlichen Protease (6). Dabei entstehen Insulin, C-Peptid sowie z. T. verschiedene Spaltprodukte, die sich von Proinsulin durch die reduzierte Anzahl der Aminosäuren unterscheiden. Diese Produkte werden zusammen mit Proinsulin ins Serum abgegeben. Die Spaltprodukte unterscheiden sich in ihrem Verhalten kaum vom Proinsulin, weshalb sie im Serum

radioimmunologisch als Proinsulin mitbestimmt werden. Es ist daher richtiger, von PLM (Proinsulin-like material) im Serum zu sprechen.

Proinsulin läßt sich beim Menschen im Urin und im Serum nachweisen (7, 8). GORDON (9), MELANIE (10), HEDING (11) et al. (12) gaben basale Proinsulinwerte bei Gesunden mit etwa 20 % des gesamten IRI (immunoreaktives Insulin) an. Diese Werte verringern sich bei oraler oder intravenöser Glukosebelastung. Krankheitsbilder mit Hyperinsulinämie wie Akromegalie (13), Hyperprolaktinämie, Morbus Cushing (6), Adipositas (14) und bei der Schwangerschaft (12) zeigen häufig eine verminderte Glukosetoleranz. Hier spielt eine erhöhte periphere Insulinresistenz eine wichtige Rolle (6, 13). Ob ein Teil des bestimmten immunoreaktiven Insulins als Proinsulin vorliegt, das eine geringere biologische Aktivität besitzt, war Frage dieser Doktorarbeit.

Insulinome und noch mehr Inselzellcarzinome gehen mit stark erhöhten Seruminsulinwerten einher. Dabei sind hohe Proinsulinanteile zu finden, wie erstmals LAZARUS und Mitarbeiter (15) berichteten. Die geringe biologische Aktivität des Proinsulins, das bei diesen Patienten einen Anteil bis zu 80 % und darüber erreicht (16, 17), erklärt zeitweise das begrenzte Ausmaß der Hypoglykämie bei exzessiven IRI-Werten.

Eine weitere Gruppe von Krankheitsbildern mit vermehrter Proinsulinsekretion läßt sich abgrenzen. 1979 berichtete KANAZAWA (18) über eine japanische Familie mit abnormer Glukosetoleranz bei familiärer Hyperproinsulinämie. Bis 90 % Proinsulin am gesamten IRI wurden bestimmt. GABBAY

et al. (19) beschrieben kürzlich einen Fall familiärer Hyperproinsulinämie, dem ein autosomal dominant vererblicher Defekt zugrunde lag; hier überwog Proinsulin im basalen wie im stimulierten Zustand.

Zu den oben beschriebenen Gruppen kontrastiert ein von GIVEN und MAKO (20) kürzlich beschriebener Fall von Diabetes mellitus bei einem 51-jährigen Patienten mit Hyperinsulinämie. Insulinantikörper lagen nicht vor, ebensowenig erhöhte Spiegel von Glucagon, hGH, Cortisol. Hyperproinsulinämie mit geringer biologischer Aktivität bestätigte sich nicht. In diesem Fall handelte es sich um ein abnormes Insulin mit stark abgeschwächter biologischer Aktivität.

1.2. Eigenschaften des Proinsulins

Proinsulin ist ein Polypeptid, bestehend aus 84 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 9000 (Abb. 1). Es be-

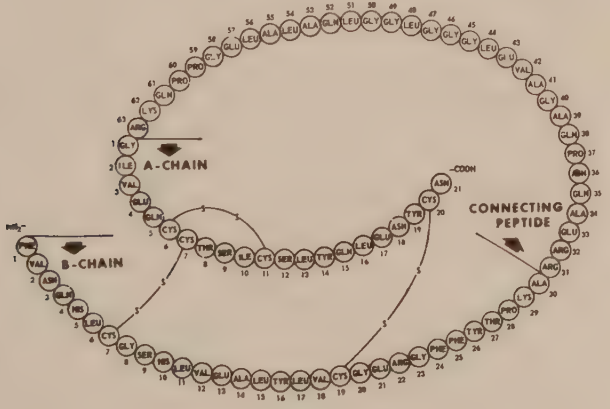


Abb. 1: Primärstruktur des humanen Proinsulinmoleküls (nach P. E. OYER et al., J. Biol. Chem. 246:1375, 1971)

steht aus einem Insulinmolekül - zwei Polypeptidketten, der sog. A- und B-Kette, die durch zwei Disulfidbrücken zusammengehalten werden - dessen beide Ketten durch das sog. C-Peptid (Connecting Peptide), beim Menschen aus 35 Aminosäuren bestehend, verbunden werden. Die energetisch aufwendige Ausbildung der im Insulinmolekül vorliegenden Disulfidbrücken ist beim Proinsulin umgangen durch die Ausbildung der jetzt intrachenaren Disulfidbrücken, die durch die Tertiärstruktur erleichtert wird. Die biologische Aktivität von Proinsulin ist qualitativ ähnlich der des Insulins, jedoch quantitativ geringer (21, 22). Abhängig von der Methode berichteten verschiedene Autoren über Werte zwischen 2 und 20 % (23, 24). Diese Eigenschaft sowie die verminderte Bindungskapazität an Insulinrezeptoren (25) legte den Schluß nahe, daß das C-Peptid im Proinsulinmolekül funktionell wichtige Bereiche des Insulinmoleküls abdeckt (21).

STARR und RUBENSTEIN (26) untersuchten an drei Patienten mit einem Inselzelladenom die Plasmahalbwertszeit von Proinsulin. Dabei zeigte sich, daß sie mit 18 - 20 Minuten die Halbwertszeit des Insulins um mehr als das dreifache übertraf. Diese Eigenschaft begünstigt die Höhe der Plasma-Proinsulinspiegel.
Die meisten Insulinantiseren, die im Insulinimmunoassay verwendet werden, zeigen Kreuzreaktion mit Proinsulin; der als IRI bestimmte Wert enthält damit einen gewissen Anteil an Proinsulin. Diese Kreuzreaktivität ist sehr unterschiedlich und vom jeweiligen Antiserum abhängig. Werte von 17 bis 50 % und mehr werden in der Literatur angegeben (21, 27, 28). Weiterhin bestehen speziesspezifische Unterschiede im Reaktionsverhalten, sowohl von Insulin, wie auch

von Proinsulin (24). Dies ist für die radioimmunologische Bestimmung von besonderer Bedeutung, da humanes Proinsulin nur in geringer Menge verfügbar ist. Häufig wurde auf Proinsulinstandard vom Schwein bzw. Rind ausgewichen (29). Wie KITABCHI (21) in seiner Arbeit zeigte,liegen entsprechende Standardkurven für Insulin und Proinsulin nicht parallel und variieren stark in Abhängigkeit vom jeweiligen Antikörper (27).
In entsprechender Weise kreuzreagiert Proinsulinantiserum mit Insulin.

Wie schon aus der Struktur des Proinsulinmoleküls zu vermuten, zeigt C-Peptid keine Kreuzreaktivität mit Insulinantiserum, wohl dagegen mit Proinsulinantiserum (30). Andererseits reagiert Insulin nicht mit C-Peptidantiserum. Diese Eigenschaften lassen sich in spezifischen Immunoassays nutzbar machen (11, 31).

1.3. Bestimmungsmethoden

Aus diesen Ausführungen ergibt sich als stetiges Problem der radioimmunologischen Bestimmung von Proinsulin die Kreuzreaktivität mit Insulin bzw. mit C-Peptid. Erstes Ziel jeder Bestimmung ist es deshalb, die Reaktionspartner zu isolieren. Dabei wurden bisher im wesentlichen folgende Bestimmungsmethoden beschrieben:

1. Die am häufigsten angewandte Methode zur Trennung von Proinsulin und Insulin unterzieht Serum oder dessen Extrakte der Säulenchromatographie mit Sephadex G 50 oder Bio-Gel-P 30. Als Elutionspuffer werden meist Essigsäure, Phosphat oder Borat verwendet. In den erhaltenen Fraktionen wird direkt oder nach Konzentrierung das Hormon radioimmunologisch bestimmt (9, 21, 26, 27, 32). Diese Methode wurde von uns angewendet.

2. Serum wird mit einer aus Rattenleber isolierten Protease inkubiert. Diese spaltet Insulin in im Radioimmunoassay nicht meßbare Komponenten, ohne Proinsulin zu verändern. Proinsulin kann anschließend im Insulinimmunoassay bestimmt werden (33, 34). Diese Methode soll jedoch falsch hohe Proinsulinanteile liefern (35), da die Degradation von Insulin doch nur partiell geschieht und abhängig von der Insulinkonzentration ist.

3. Inzwischen veröffentlichte HEDING (11) eine sehr elegante Methode, die vereinfacht folgendermaßen abläuft:
An Sepharose gebundene Insulinantikörper werden in Serum gegeben, das sowohl Insulin wie auch Proinsulin und C-Peptid enthält. Insulin und Proinsulin werden gebunden, C-Peptid verbleibt nach Zentrifugieren im Überstand und kann dort bestimmt werden. Das gebundene Proinsulin wird nun direkt im C-Peptid-Assay bestimmt, d. h. mit C-Peptidantikörper versetzt und mit ^{125}J-Tyr-C-Peptid inkubiert, anschließend wird der antikörpergebundene Tracer mit 95 %igem Alkohol extrahiert und bestimmt.

4. Direkte radioimmunologische Messung von Proinsulin mit Proinsulin-spezifischen Antikörpern, die mit Hilfe biosynthetischen humanen Insulins gewonnen wurden (36).

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

1. Aufbau einer reproduzierbaren und praktikablen Methode zur Bestimmung von Proinsulin aus Serum.

2. Bestimmung der basalen und durch OGTT stimulierten Insulin- und Proinsulinwerte bei Normalpersonen und Patienten mit Adipositas, Akromegalie, Insulinom und Inselzellcarcinom.

3. Beantwortung der Frage, ob die Bestimmung des Proinsulin-Gehaltes im Serum zur Diagnostik eines Insulinoms respektive Inselzellcarcinoms beitragen kann.

2. METHODE

2.1. Material

Konzentrierte Essigsäure, Äthylalkohol (96 %), Dinatriumtetraborat ($Na_2B_4O_7$. 10 H_2O), Natriumdihydrogenphosphat und NaCl waren "pro analysi" von der Firma Merck, Darmstadt. Als Albumin verwendeten wir Rinderalbumin Fraktion V der Firma Roth.
Bio-Gel P-30 stammte von der Firma Bio.Rad Laboratories Griffin/Richmond/California, Sephadex von der Firma Pharmacia Fine Chemicals Uppsala/Schweden. Der Insulin-Kit wurde von der Firma Amersham und Buchler GmbH, Braunschweig, bezogen. Human-Insulinstandard und Insulinantikörper waren von der Firma Welcome Res. Lab. Beckenham/England, Rinderproinsulinstandard und ^{125}J-Rinderproinsulin von der Firma Novo Research Institute/Kopenhagen, ^{125}J-Rinderinsulin von der Firma Behring, Marburg. Der hGH-Standard stammte von der Deutschen Kabi, München. Als hGH-Antiserum diente von Kaninchen gewonnenes Antiserum K_3 oder der Ziegen-hGH-Antikröper. Anti-Kaninchengammaglobulin vom Esel war von der Firma Wellcome Res. Lab./Beckenham England. Die Test-Combination Gluco-quant ® zur Glucosebestimmung war ein Produkt der Firme Boehringer, Mannheim.

Verwendete Elutions-Lösungen bei der Säulenchromatographie:

1 - Essigsäure I:
3 M Essigsäure, 0,5 % Rinderalbumin (Frakt.V), pH 1,8

2 - Essigsäure II:
1 M Essigsäure, 0,5 % Rinderalbumin (Frakt.V), pH 2,1

3 - Boratpuffer I:
130 mM Borat, 0,5 % Rinderalbumin (Frakt.V), 0,02 % Na-Acid, pH 7,4

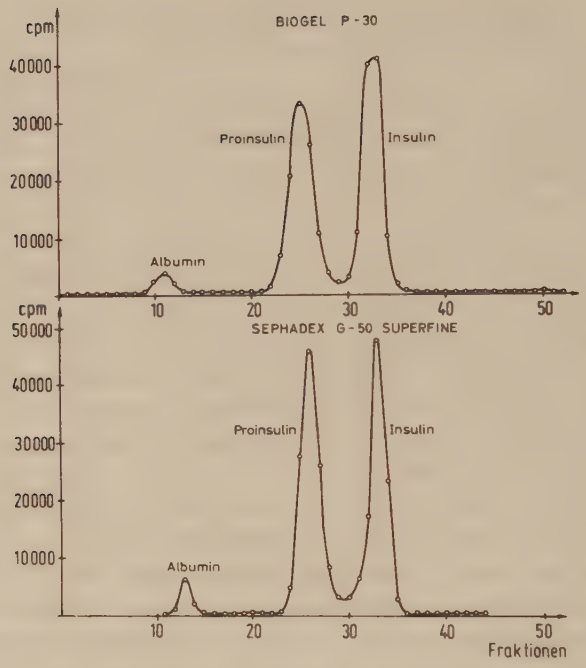
4 - Boratpuffer II:
50 mM Borat, 0,5 % Rinderalbumin (Frakt.V), 0,02 % Na-Acid, pH 7,4

2.2. Säulenchromatographische Trennung von Insulin und Proinsulin

Die Trennung von Insulin und Proinsulin in Serum beruht auf dem säulenchromatographischen Prinzip der Gelfiltration. Als Gel wurden Bio-Gel P 30 und Sephadex G-50 Superfine verwendet.

2.2.1. Bio-Gel P 30 - Elution mit 3 M Essigsäure

Gearbeitet wurde mit Säulen der Dimension 0,9 x 50 cm und 1,0 x 100 cm. Das trockene Gel wurde entsprechend dem Quellvolumen von ca. 11 ml/g Trockensubstanz und dem Säulenvolumen abgewogen und mit reichlich Aqua dest. versetzt (mindestens 2 Säulenvolumina). Dann wurde das Gel für einen Tag bei Raumtemperatur zum Quellen gebracht. Aqua dest. wurde während des Säulengießens benutzt, da der albuminhaltige Elutionspuffer zur Blasenbildung führte. Die gegossenen Säulen wurden mit mindestens 3 Säulenvolumina Elutionspuffer äquilibriert. Als Elutionspuffer diente Essigsäure I (3 M Essigsäure mit 0,5 % Rinderalbumin (Frak.V) bei einem pH von 1,8).
Zur Überprüfung der Trennungskapazität einer Bio-Gel P-30 Säule wurde ein Gemisch mit je 60 µl ^{125}J-Proinsulin und Insulin auf die Säulen aufgetragen und mittels Essigsäure I bei einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 8 ml/h eluiert. Die Fraktionen à 0,5 ml wurden im Tracerlab gezählt. Die Trennung von Proinsulin und Insulin mittels einer 50 cm langen Säule ist in Abb. 2 oberer Teil dargestellt. Die Peaks für Insulin und Proinsulin umfaßten ca. 6 Fraktionen bei geringer Überlappung. Diese Methode ist zu Beginn der 70er Jahre zuerst von STEINER und RUBENSTEIN beschrieben (7) und seitdem von anderen Untersuchern verwendet worden (6, 24, 32).



Abbs. 2: Säulenchromatographische Trennung von je 60 µl ^{125}J-Proinsulin und -Insulin über Bio-Gel P-30 (Säulendimension 0,9 x 50 cm, Elutionspuffer 3 M Essigsäure, oben) und Sephadex G-50 Superfine (Säulendimension 0,8 x 42 cm, Elutionspuffer 1 M Esseigsäure, unten), Fraktionen zu je 0,5 ml. Jede Fraktion wurde 0,2 Minuten im Gamma-Guard gezählt, der Wert auf 1 Minute umgerechnet.

Um eine Überlappung der beiden Peaks zu vermeiden, also eine vollständige Trennung von Insulin und Proinsulin zu erreichen, wurden die Säulen auf 100 cm verlängert. Die Durchflußgeschwindigkeit erreichte am Anfang des Laufes nur noch 4 ml/h; das Gel verdichtete sich immer mehr unter Abnahme der Durchflußrate,die schließlich fast ganz sistierte. Damit war die Grenze der Praktikabilität überschritten.

2.2.2. Sephadex G-50 Superfine Elution mit 1 M Essigsäure

Die in der Literatur beschriebene Alternative zu Biogel P 30 ist die Trennung mittels Sephadex G-50 Superfine. Es wurde mit Säulen der Dimensionen 0,8 x 42 cm gearbeitet. Trockenes Gel wurde entsprechend dem Quellvolumen von ca. 10 ml/g getrocknetes Sephadex abgewogen und mit Aqua dest. versetzt. Quellen, Gießen der Säulen und Äquilibrieren wurde wie schon in 2.2.1. beschrieben durchgeführt. Als Elutionsmedium dienten 1 M Essigsäure pH 2,1 mit Rinderalbuminkonzentrationen (Frakt. V von Roth) von 0 - 0,5 %. Die Durchflußrate betrug 9 - 10 ml/h bei einer Säule von 0,8 x 42 cm. Die Versuche wurden wie bereits unter 2.2.1. beschrieben durchgeführt und ergaben etwa die gleichen Resultate wie die Trennung mit Bio-Gel bei 3 M Essigsäure (Abb. 2 unten).

Da jedoch Essigsäure mit einem pH von 1,8 - 2,1 die radioimmunologische Bestimmung störte, konnte sie nicht als Elutionsflüssigkeit verwendet werden, auf Boratpuffer I mußte ausgewichen werden.

2.2.3. Bio-Gel P 30 Elution mit Boratpuffer I

Verwendet wurde die bereits unter 2.2.1. beschriebene Säule, nachdem sie mit Boratpuffer I äquilibriert war. Proinsulin-, und Insulin-Tracer wurden nacheinander über die Säule chromatographiert, die Resultate im Diagramm übereinander aufgetragen. Wie aus Abb. 3 oben ersichtlich, überlagerten beide Peaks relativ stark.

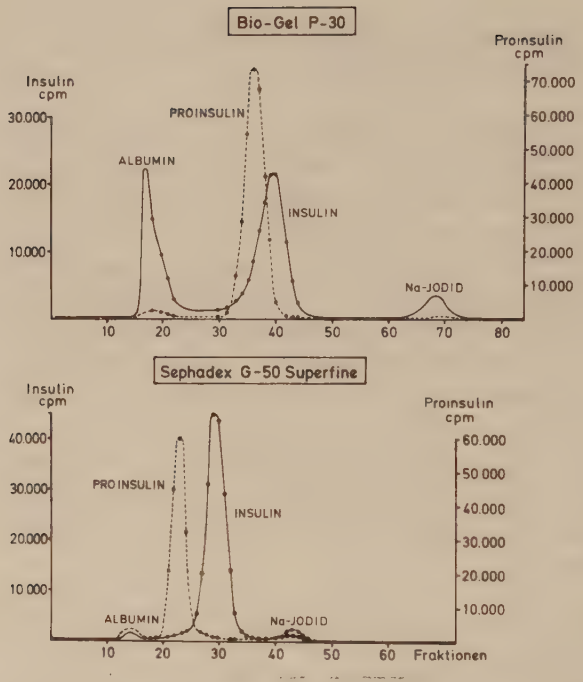


Abb. 3: Säulenchromatographische Trennung von je 20 µl ^{125}J-Proinsulin und 100 µl ^{125}J-Insulin über Bio-Gel P-30 (oben, Säule 0,9 x 50 cm) und Sephadex G-50 Superfine (unten, Säule 0,8 x 42 cm) Fraktionen von je 0,5 ml. Elutionspuffer: Boratpuffer I.

2.2.4. Sephadex G-50 Superfine Elution mit Boratpuffer I

Gearbeitet wurde mit der aus 2.2.2. bekannten Säule der Dimension 0,8 x 42 cm, mit Boratpuffer I nach Äquilibrieren, die Durchflußgeschwindigkeit lag wiederum bei 9 - 10 ml/h. Bei analog durchgeführten Versuchen zeigte sich im Gegensatz zur Chromatographie mittels Bio-Gel P 30 bei Sephadex G-50 Superfine und Boratpuffer I eine gute Trennung zwischen

Proinsulin und Insulin (Abb. 3 unten). In weiteren Versuchen wurden daher nur noch Sephadex G-50 Superfine Säulen verwendet.
Boratpuffer erwies sich für den Radioimmunoassay als geeignet (siehe 2.4.2.). Deshalb wurde trotz der etwas schlechteren Trennung im Vergleich zu Essigsäure (vgl. Abb. 2) weiterhin mit Boratpuffer I gearbeitet (130 mM Boratpuffer, versetzt mit 0,5 % Rinderalbumin, 0,02 % Na-Acid bei pH 7,4). In späteren Versuchen wurden die Säulen wegen der besseren Konzentrierungsmöglichkeit mit 50 mM Boratpuffer (Boratpuffer II, siehe 2.3.2.3.4.) eluiert, der eine ähnliche chromatographische Trennung lieferte.

2.2.5. Veränderung der Säulendimensionen

In weiteren Versuchen wurden die Säulenlängen geändert, um die Trennung zu verbessern. Die Versuche wurden,wie bereits unter 2.2.4. beschrieben, durchgeführt. Die Säulendimension betrug 0,9 x 100 cm bzw. 0,9 x 140 cm, die Fließgeschwindigkeit ca. 18 und 15 ml/h. Abb. 4 zeigt den Vergleich der verschiedenen Säulen: Mit zunehmender Länge werden die Peaks breiter, es tritt ein Verdünnungseffekt ein. Wichtiger ist jedoch, daß beide Peaks besser getrennt sind. Aus Gründen der Praktikabilität verwendeten wir weiterhin die Säulen der Dimension 0,9 x 100 cm (bzw. 1,0 x 100 cm), wobei eine ausreichende Trennung erreicht wurde.

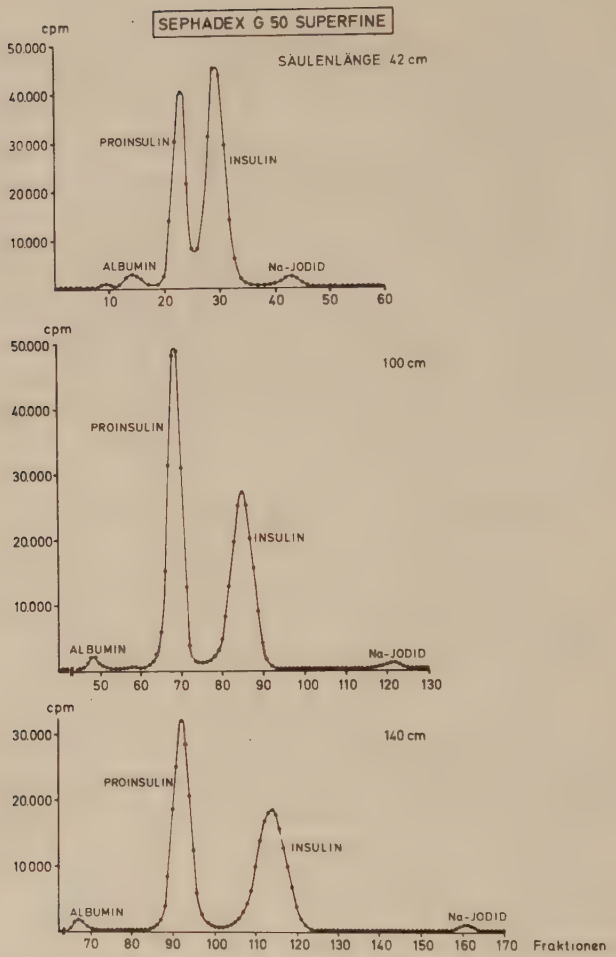


Abb. 4: Variation der Säulenlänge bei Säulenchromatographie von ^{125}J-Proinsulin und ^{125}J-Insulin über Sephadex G-50 Superfine mit Boratpuffer I
Säulendimension: 0,8 x 42 cm (oben)
0,9 x 100 cm (mitte)
0,9 x 140 cm (unten)
Fraktionen von je 0, 5 ml.

2.2.6. Identifizierung der eluierten Peaks

Zur weiteren Identifizierung der eluierten Peaks wurden die markierten Substanzen ^{125}J-Proinsulin, ^{125}J-Insulin, ^{131}J-Albumin, ^{125}J-Na in Puffer separat chromatographiert.

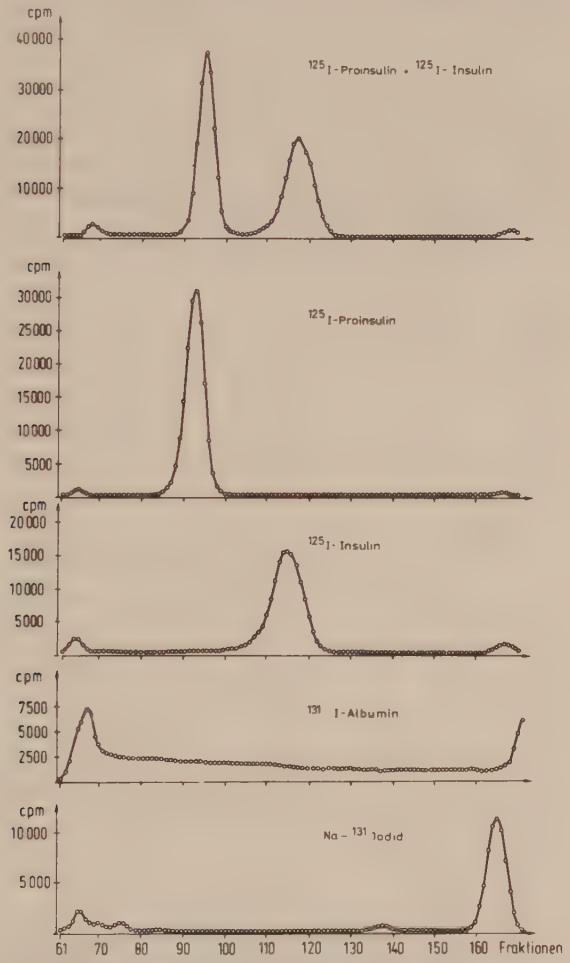


Abb. 5 : Identifizierung der bei der Säulenchromatographie eines ^{125}J-Proinsulin- und ^{125}J-Insulingemisches eluierten Peaks (oben) mittels Säulenchromatographie der Einzelsubstanzen

^{125}J-Proinsulin	Kurve 2	^{131}J-Albumin	Kurve 4
^{125}J-Insulin	Kurve 3	^{131}J-Na	Kurve 5

Fraktionen 0,5 ml. Säule 0,9 x 140 cm, Sephadex G-50 Superfine, Boratpuffer I

Dieser Versuch bestätigte unsere bisherigen Ergebnisse: Im ersten kleinen Peak eluierten hochmolekulare Substanzen wie ^{131}J-Albumin. Der zweite und dritte Peak enthielt Proinsulin und Insulin. Der kleine Peak ganz rechts besteht aus ^{125}J-Na.

2.2.7. Rechromatographie

Zur Überprüfung der Homogenität der chromatographierten Insulin- und Proinsulin-Peaks wurden die Mittelfraktionen dieser Peaks rechromatographiert (Abb. 6).

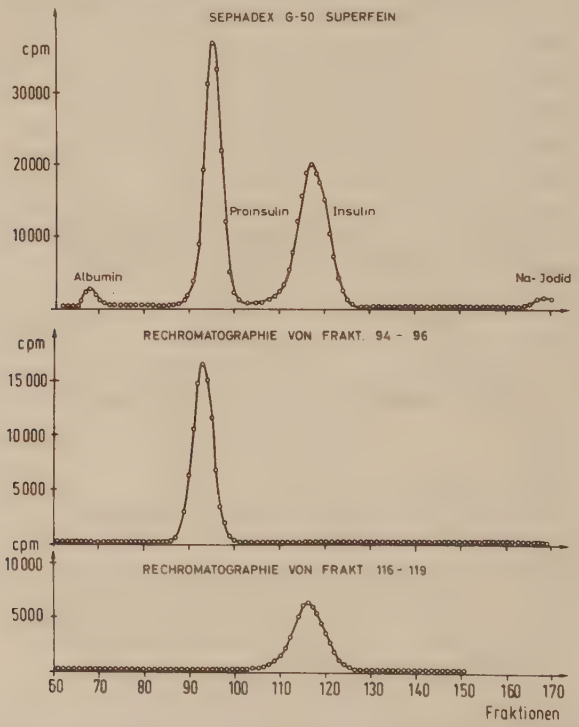


Abb. 6: Rechromatographie der höchsten Fraktionen jedes Peaks (Fraktion 94-96 bei Proinsulin, mitte, und Fraktion 116-119 bei Insulin, unten) nach Chromatographie eines Gemisches von ^{125}J-Insulin und ^{125}J-Proinsulin (oben) Säule 0,9 x 140 cm, Sephadex G-50 Superfine, Boratpuffer I

Drei bzw. vier der Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität jedes Peaks wurden gepoolt und wieder auf die Säule aufgetragen. Die Aktivität fand sich an gleicher Stelle wieder.

2.2.8. Chromatographie von Serum

Die bisherigen Versuche beschränkten sich auf Tracer, der in Mengen bis 100 µl aufgetragen wurde. Die Chromatographie von Serum, versetzt mit einem Gemisch von ^{125}J-Insulin und ^{125}J-Proinsulin respektive von nicht markiertem Insulin und Proinsulin ist in Abb. 7 dargestellt.

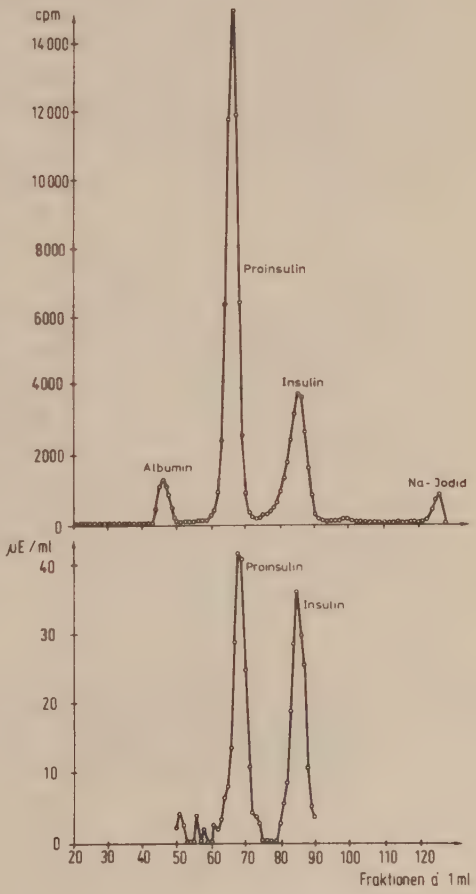


Abb. 7: Vergleichende Säulenchromatographie von ^{125}J-Insulin und -Proinsulin (oben) respektive Standard-Proinsulin und Insulin (unten) in je 2 ml Serum. Bei den Standards wurden die einzelnen Fraktionen radioimmunologisch bestimmt, für die Erstellung der Standardkurven dienten in Elutionspuffer gelöste Insulin- und Proinsulinstandardpräparationen. Säule 1 x 135 cm, Sephadex G-50 Superfine, Boratpuffer II.

Nach mehreren Läufen mit Patienten-Seren sinterte die Länge der Gel-Säule geringfügig zusammen, so daß Kontrollen mit Tracer in Serum (2 ml) nach jeder fünften Serumchromatographie durchgeführt wurden.
In Nüchtern-Seren sind die Insulin- und Proinsulinwerte sehr niedrig. Um für die Bestimmung eine ausreichende Konzentration zu erreichen, mußte möglichst viel Serum auf die Säule aufgetragen werden. Im Vorversuch wurden deshalb 4 ml Serum - vermischt mit Insulin- und Proinsulin-Tracer - auf die Säule aufgetragen (Abb. 8).

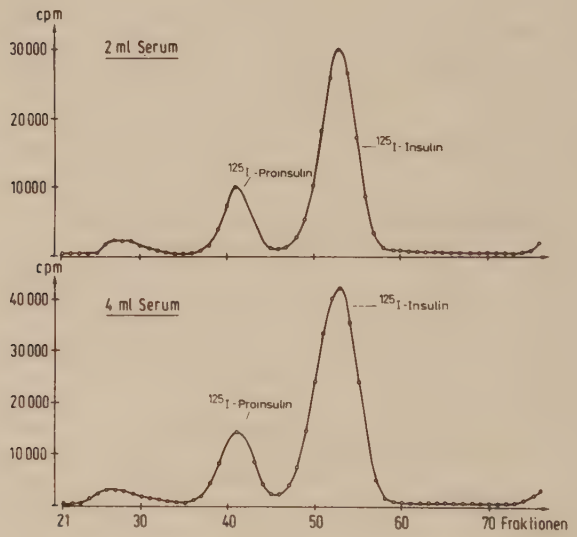


Abb. 8: Säulenchromatographie vom 2 ml (oben) und 4 ml (unten) Serum, versetzt mit ^{125}J-Proinsulin und ^{125}J-Insulin. Säule 1 x 100 cm, Sephadex G-50 Superfine, Boratpuffer II.

Bei diesem Volumen verbreiteren sich die Peaks etwas mehr, die Trennung war jedoch noch ausreichend. Bei der Chromatographie von Patienten-Seren wurde deshalb ein Volumen von 4 ml Serum verwendet.

Die Wiederfinderate von an Puffer zugesetzten nicht markiertem Standard-Insulin respektive -Proinsulin betrug im Mittel 85 $\pm$ 6 % (Bereich 79 - 92 %) für beide Hormone. Die gleiche Wiederfindung ergab sich, wenn Puffer mit markiertem Insulin oder Proinsulin verwendet wurde, oder wenn markiertes bzw. nicht markiertes Insulin und Proinsulin Seren mit sehr niedrigen endogenen Insulinkonzentrationen (ca. 4 - 5 µE/ml) zugefügt war. Wurde in Patienten-Seren vor der Chromatographie das gesamte IRI gemessen und verglichen mit der Summe nach Chromatographie gemessener Proinsulin- und Insulinfraktionen, so ergab sich eine Wiederfinderate von im Mittel 69 $\pm$ 4 % (Bereich 64 - 72 %). Dieser Bereich wurde auch in der Literatur beschrieben (9).

2.3. Konzentrierung

Die Konzentration von Proinsulin im Serum ist besonders unter Basalbedingungen sehr gering. Entsprechend niedrig ist der Gehalt von Proinsulin in den Fraktionen nach der Gelfiltration. Daher muß der radioimmunologischen Bestimmung von Proinsulin eine Konzentration vorgeschaltet werden. Zwei Möglichkeiten bieten sich an: Anreicherung des Proinsulins im Serum vor der chromatographischen Trennung oder Konzentrierung der von der Säule eluierten proinsulinhaltigen Fraktionen.

2.3.1. Konzentrierung des sich im Serum befindlichen Proinsulins und Insulins

2.3.1.1. Extraktion mit saurem Alkohol

Benutzt wurde eine Modifikation der Methode nach DAVOREN (37). Pro Milliliter Serum wurden 2 ml Aqua dest. und 7,5 ml saurer Alkohol (375 ml 95 % Alkohol + 7,5 ml konzentrierte Salzsäure) zugegeben und für 10 Stunden bei 4°C belassen. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand mit Ammoniak auf pH 8,5 gebracht. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand mit Salzsäure auf pH 5,3 eingestellt (Methylrot als Indikator). Nun wurde 0,025 ml 2 N Ammoniumacetat (pH 5,3) pro ml Extrakt zugegeben. Die Proteine im Überstand wurden mit 15 ml absolutem Alkohol + 25 ml Diäthyläther pro 10 ml Überstand präzipitiert. Nach Lagerung für 12 bis 16 Stunden bei 4°C wurden die Proben zentrifugiert, das Präzipitat in 3 M Essigsäure gelöst. Die verwendeten Glasgefäße waren silikonisiert. Die Methode war sehr aufwendig und aufgrund der großen Volumina wenig praktikabel. Außerdem lag die Wiederfinderate nur bei 16,5 %.

2.3.1.2. Extraktion nach Alkoholpräzipitation

Es wurde eine Modifikation der von HEDING beschriebenen Methode benutzt (38). Zu 1 ml Serum wurden 1,8 ml 96 %iger Äthylalkohol gegeben und geschüttelt. Danach wurden die Proben 20 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in enghalsige Erlenmayerkolben pipettiert und bei ca. 50 mmm Hg und Zimmertemperatur über eine Kältefalle lyophilisiert. Der Vorgang dauerte etwa 40 bis 48 Stunden. Der eingedampfte Rückstand wurde in 2 ml Boratpuffer I ge-

löst. Die Glasgefäße waren wiederum silikonisiert. Bis zu 9 ml Serum pro Probe wurden extrahiert. Die Experimente wurden mit markiertem Insulin und Proinsulin in Serum und mit endogenen Hormonen durchgeführt. Die Verluste waren für Insulin und Proinsulin gleich. Die Wiederfindungsrate lag bei 85 $\pm$ 6 % (Bereich von 71 - 95 %).

Nach Aufnahme des Rückstandes in 2 ml Boratpuffer I wurde mit Sephadex G-50 Superfine Säulen chromatographiert (siehe 2.2.). Die gesammelten 1 ml-Fraktionen wurden im Tracerlab gezählt respektive radioimmunologisch bestimmt und von entsprechenden Standardkurven abgelesen. Insulin und Proinsulin wurden genau an gleicher Stelle eluiert wie in den zahlreichen Vorversuchen, so daß eine molekulare Veränderung der Hormone nicht anzunehmen war. Dabei ergab sich eine Wiederfindungsrate nach Alkoholpräzipitation und Säulenchromatographie von 62 $\pm$ 18 % (Bereich von 47 - 120 %).

Für eine exakte fraktionsweise Bestimmung der eluierten Peaks, insbesondere bei Proinsulin, war die Konzentration zu gering. Ein Poolen der Proinsulinfraktionen mit anschließender weiterer Konzentrierung, z.B. mittels Gefriertrocknung, ergab meßbare Spiegel an Proinsulin. Damit wurde jedoch die Methode sehr zeitaufwendig und in Anbetracht der Verluste bei der Extraktion verblieb ein geringer Konzentrierungseffekt. Außerdem bildeten sich beim Lösen der auf die Säule aufzutragenden Proben kleine Partikel, vermutlich beim Zentrifugieren nicht vollständig entfernte Proteinreste, die zur Ausbildung einer wenig durchlässigen Grenzschicht führten. Nach wenigen Proben sank die Durchflußrate unter eine prak-

tikable Toleranzgrenze ab. Auch erneutes Zentrifugieren der Proben vor Aufbringen auf die Säule änderte wenig. Diese Methode zur Konzentrierung der Insulin- und Proinsulinmengen in Serum wurde deshalb verlassen.

2.3.1.3. Molekularfiltration

Wir verwendeten Filter und Geräte der Firma Millipore, Neu-Isenburg. Das Prinzip beruht auf einer Separation großmolekularer Substanzen (z.B. Albumin) von solchen mit niederem Molekulargewicht. Dies wurde durch Filtration über sogenannte "Millipore Pelikon Filter" erreicht. Dabei handelte es sich um 2-Komponenten-Membranen, die aus einem extrem dünnen (200 - 300 Å), durchgehenden polymeren Film bestanden, der auf ein Trägermatieral aus gemischtem Zellulose-Ester (ca. 150 µm dick) aufgetragen war ("Molekular-Filtration", AR 801 der Firma Millipore). Um einen ausreichenden Durchfluß zu erreichen, wurde die Filtration mittels Stickstoff bei einem Druck von ca. 2,0 bar betrieben. Die sich auf der Membranfläche bildende Schicht von Makromolekülen, die sogenannte Konzentrationspolarisation, die den Durchfluß erheblich störte, wurde durch eingebaute Magnetrührer möglichst gering gehalten.

Die Filtermembranen wurden zuerst mit Aqua dest. befeuchtet und anschließend in die Filterzellen eingebaut. Je 10 ml Boratpuffer I oder Serum, jeweils Proinsulin- oder Insulin-Standard respektive Tracer enthaltend, wurden in die Filterzelle pipettiert. Diese wurde verschlossen, das Rührwerk in Gang gesetzt und ein Druck von 2 bar mit N_2 eingestellt. Das Filtrat wurde in kleinen Meßzylindern gesammelt, die ein problemloses Ablesen der filtrierten Menge gestatteten.

Das tote Volumen im System betrug 0,5 ml. Der Vorgang dauerte ca. 1 bis 1 1/2 Stunden bei Konzentration des Überstandes von 10 ml auf 2 ml. Das Filtrat bzw. der Überstand wurde radioimmunologisch bzw. in Gamma Guard bestimmt.

Die Molekularfiltration erlaubte uns zwei Wege der Konzentrierung: Bei der ersten Möglichkeit konzentrierten wir Serum vor der gelchromatographischen Trennung. Wir verwendeten dabei Membranen mit einer Nominal-Molekulargrenze von 1000, d. h. Moleküle mit einem Molekulargewicht von > 1000 Daltons wurden nahezu vollständig auf den Membranen zurückgehalten, so auch Insulin und Proinsulin. Der Überstand war zur Gelfiltration bestimmt. Standards oder makiertes Insulin und Proinsulin wurden in Serum gebracht, je 10 ml davon bis auf 2 ml eingeengt und die Konzentration an Hormonen bestimmt. Die Wiederfinderate für Insulin und Proinsulin lag im Bereich von 85 - 100 %. Bei der Säulenchromatographie des konzentrierten Überstandes, der markiertes Hormon enthielt, ergaben sich breite, überlappende Peaks, eine Trennung war nicht möglich.

In einer zweiten Versuchsreihe filtrierten wir zuerst mit einem Filter der Nominalmolekulargewichtsgrenze von 100 000, um großmolekulare Substanzen wie Albumin abzugrenzen, Insulin und Proinsulin im Filtrat zu erhalten. In einem weiteren Schritt wurde dieses Filtrat über dem Filter mit der Ausschlußgrenze von 1000 Daltons konzentriert. Dieser Überstand war wiederum zur Gelfiltration bestimmt. Hier zeigte sich jedoch, daß beim ersten Schritt der Filtration nicht

nur hochmolekulare Substanzen, sondern auch Insulin und Proinsulin weitgehend im Überstand verblieben; dies kam in einer Wiederfindungsrate im Filtrat von 1 - 5 % zum Ausdruck.

2.3.2. Konzentrierung des im eluierten Puffer sich befindenden Proinsulins

2.3.2.1. Molekularfiltration

Die nach Säulenchromatographie gepoolten hormonhaltigen Boratpuffer-Fraktionen wurden über die Membran der Nominal-Molekulargewichtsgrenze 1000 konzentriert. Im Überstand befanden sich dann Insulin und Proinsulin. Wiederum 10 ml Puffer wurden auf 2 ml konzentriert. Dabei ergab sich eine Wiederfinderate für Insulin von 70 - 100 %, für Proinsulin von 63 - 100 %. Die durch das System bedingten Verluste (Filter, Zelle, Schlauch u.a.) lagen im Bereich von weniger als 10 %. Diese Variante der Molekularfiltration war im Ansatz ein brauchbares Verfahren. Allein der Bewältigung einer größeren Probenzahl war sie nicht gewachsen.

2.3.2.2. Dialyse

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Elutionspuffer nach Gelfiltration zu verdünnen, da beim Eindampfen das Löslichkeitsprodukt des Borats rasch überschritten wurde und dadurch schwerlösliche Kristalle gebildet wurden. Im Prinzip diffundiert das Borat durch eine semipermeable Membran (Dialyseschlauch) gegen Aqua dest. Dabei sollte der Puffer größtenteils vom Borat befreit werden, während hochmoleku-

lare Substanzen wie Insulin, Proinsulin und Albumin zurückgehalten wurden. Die letzteren ließen sich dann nach dem Eindampfen leicht in Lösung bringen.
Wir verwendeten aus regenerierter Zellulose bestehende Dialyseschläuche der Firma Serva Feinbiochemika/Heidelberg mit einem Innendurchmesser von 7 mm und einem Porendurchmesser von 15 - 20 Å. Die Dialyse dauerte 3 1/2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die Schläuche in silikonisierte Erlenmeyerkolben entleert. Das Dialysat wurde nun über eine Kältefalle bei 50 mm Hg und Raumtemperatur zur trockenen Substanz eingedampt; dieser Schritt nahm vier Tage in Anspruch. Der Rückstand wurde in 2 ml Boratpuffer I aufgenommen und im Radioimmunoassay bestimmt. Dies entsprach einer Konzentrierung von 5:1. Hier lagen die Wiederfindungsraten allein nach Dialyse - mittels Tracer gemessen - für Proinsulin bei 6 - 27 % mit einem Mittelwert von 20 %, für Insulin 9 - 60 %, Mittelwert 33 %. Bei der anschließend notwendigen Konzentrierung kam es zu weiteren Verlusten.

2.3.2.3. Eindampfen des Eluates bei Raumtemperatur

2.3.2.3.1. Insulin und Proinsulin in Essigsäure

Eine von STEINER u.a. häufig beschriebene Methode zur Konzentrierung der nach Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen ist das Eindampfen (7, 9, 32). Dabei ergibt sich zugleich die Möglichkeit, die bei der Säulenchromatographie verwendete Essigsäure, die die radioimmunologische Bestimmung von Insulin und Proinsulin stört, durch einen anderen Puffer, meist Phosphatpuffer, zu ersetzen.

Als Elutionsmedium diente uns Essigsäure I mit 0,5 % Albumin. Je 10 bzw. 5 ml davon, versetzt mit markiertem Insulin oder Proinsulin, wurden in Kuststoffgefäße abgefüllt. Die Proben wurden nun über eine Kältefalle bei 50 mm Hg und Raumtemperatur in ca. 18 bis 24 Stunden lyophilisiert, der Niederschlag in 1 ml Boratpuffer pH 7,4 pro 5 ml eingesetzte Essigsäure wieder aufgenommen, was einer Konzentrierung von 5:1 entsprach. Der Niederschlag ging jedoch auch nach längerem Rühren nicht in Lösung. Wurde Essigsäure ohne Zusatz von Albumin verwendet, so erhielten wir einen kaum merklichen farblosen Wandbeschlag, der auf Zugeben von Boratpuffer in eine klare Lösung überging. Ohne Albumin war jedoch mit Essigsäure säulenchromatographisch keine Trennung zu erreichen.

2.3.2.3.2. Insulin und Proinsulin in Boratpuffer

Wie bereits in 2.2. beschrieben, lieferte Boratpuffer eine brauchbare Trennung. Nun galt es, die nach Säulenchromatographie erhaltenen Insulin- und Proinsulin-Peaks zu konzentrieren. Wie bereits in 2.3.2.3.1. beschrieben, dampften wir Gefäße mit 10 bzw. 5 ml Boratpuffer, die markiertes Insulin oder Proinsulin, Standards oder Seruminsulin bzw. Proinsulin nach Säulenchromatographie enthielten, über eine Kältefalle bei 50 mmHg und Raumtemperatur vollständig ein. Der Vorgang dauerte ca. 24 bis 30 Stunden. Der kristalline Niederschlag wurde in 1 ml Aqua dest. pro 5 ml Puffer, entsprechend einer Konzentrierung von 5:1, gelöst. Da der Rückstand von 130 mM Boratpuffer nach einer fünffachen Konzentrierung nur schwer in Lösung zu bringen war, wurde 50 mM Boratpuffer verwendet (Boratpuffer II), dadurch blieb die Qualität der Trennung unverändert, und der jetzt erhaltene Rückstand löste sich relativ gut. Die mittels markiertem Insulin und

Proinsulin bestimmten Verluste durch Eindampfen lagen bei 0 - 11 %.
Die Standardreihe wurde ebenso wie die Proben im gleichen Versuch der Konzentrierung (5:1) unterworfen. Ausgehend von einer Stammlösung mit einem Gehalt von 40 µE/ml wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe angelegt, die nach 5:1 Konzentrierung Werte der Standardkurve von 200 µE/ml, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 bis 1,56 µE/ml lieferte. Je 10 bzw. 5 ml dieser Proben wurden eingedampt und, wie bereits oben beschrieben, in 1 ml Aqua dest. pro 5 ml Puffer gelöst. Ein Vergleich der so erhaltenen Standardkurve mit einer im gleichen Ansatz aufgestellten Standardkurve, die vorweg auf die fünffache Konzentration berechnet und dem Konzentrierungsvorgang nicht unterzogen war, zeigt eine deutliche Divergenz: Letztere verlief annähernd parallel nach rechts verschoben, wobei die Dreifachwerte nicht mehr überlappten. Angesichts der semilogarithmischen Skala ergaben sich somit deutlich unterschiedliche Werte beider Kurven.

2.3.2.4. Gefriertrocknung

Eine Abwandlung des im vorigen Abschnitt beschriebenen Eindampfens bei Raumtemperatur ist die Gefriertrocknung. Standards wurden wie in 2.3.2.3.2. beschrieben ausverdünnt und mit den Proben der gleichen Prozedur unterzogen, so daß etwaige Verluste ausgeglichen wurden, Insulin- und Proinsulin-Standards bzw. endogenes Insulin oder Proinsulin wurden in silikonisierte Glasgefäße abgefüllt, mit durchlöchertem Parafilm verschlossen und bei -20°C gelagert. Vor der Gefriertrocknung wurden die Proben auf -80°C gebracht. Die Gefriertrocknung geschah unter einem Vakuum von ca.30 Microns

und einer Kondensortemperatur von -50°C. Der Vorgang dauerte zwischen 24 und 30 Stunden. Die getrockneten Proben wurden bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung wurden sie in je 1 ml Aqua dest. gelöst. Der bei der Gefriertrocknung erhaltene Rückstand löste sich sehr gut. Auf diese Weise konnte eine fünffache Konzentrierung erreicht werden. Eine Vielzahl von Proben konnte gleichzeitig bearbeitet werden. Die Ergebnisse bei dieser für die Proben sehr schonenden Methode waren denen beim Eindampfen bei Zimmertemperatur vergleichbar.

2.4. Radioimmunologische Bestimmungsmethoden von Insulin und Proinsulin

Die Insulinbestimmung wurde nach der erstmals von YALOW und BERSON (39) beschriebenen, durch HALES und RANDLE zur Doppelantikörpermethode (40) verfeinerten Technik durchgeführt. Verwendet wurde der Kit der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, bzw. Human-Insulinstandard und Anti-Insulinserum der Firma Wellcome Res.Lab. Beckenham/England, ^{125}J-Rinderinsulin der Firma Sorin und der Firma Behring AG, Marburg.

2.4.1. Radioimmunologische Bestimmung des gesamten immunoreaktiven Insulins (IRI) in Serum

Der gefriergetrocknete Human-Insulinstandard wurde in Phosphatpuffer I (40 mM Phosphat, 0,5 % Rinderalbumin, 0,025 % Thiomersal, auf pH 7,4 eingestellt und zu gleichen Teilen mit 0,9 % NaCl versetzt) gelöst, mit einer Endkonzentration von 200 µM/ml. Aus dieser Stammlösung wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe hergestellt, dabei ergaben sich als

Werte für die Standardkurve 6,25 µE/ml, 12,5, 25, 50, 100 und 200 µE/ml. Der ebenfalls gefriergetrocknete Insulinantikörper wurde in 8 ml Aqua dest. pro Packung aufgenommen. Die Lösung der als Tracer verwendeten ^{125}J-Rinderinsulin-Präparation wurde mittels Phosphatpuffer II (40 mM Phosphat, 0,5 % Rinderalbumin, 0,025 % Thiomersal, pH 7,4) verdünnt, so daß 250 Picogramm markiertes Insulin in den zu Pipettierenden 0,1 ml enthalten waren. 0,1 ml Probe (Patienten-Serum) und 0,1 ml Antikörperlösung wurden sechs Stunden bei 4°C inkubiert, anschließend 0,1 ml Tracerlösung zugegeben und weitere 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Trennung der Antigen-Antikörperkomplexe von ungebundenem Tracer erfolgte mittels einer halbautomatisierten Filtrationsmethode über Zelluloseacetatfilter (41). Die auf den Filterplättchen zurückgehaltenen markierten Antigen-Antikörperkomplexe wurden in einem Gamma-Guard der Firma Tracerlab, Köln, gezählt. Die Auswertung der Dreifachwerte erfolgte mit Hilfe der Spline-Approximation nach einem von MARSCHNER veröffentlichten Programm (42) über Siemens Computer.

Interne Kontrollen in Form von gepooltem Serum liefen bei jeder Bestimmung mit. Der empfindliche Bereich der Standardkurve lag etwa bei 10 - 100 µE/ml. Serumproben mit hohen Insulinwerten wurden mittels Phosphatpuffer I verdünnt.

2.4.2. Radioimmunologische Bestimmung von Insulin in Elutionspuffer nach Säulenchromatographie

Diese Bestimmung verlief ebenso nach dem in 2.4.1. beschriebenen Prinzip bei gleichem Human-Insulinstandard, Insulinantikörper und Insulintracer. Die Insulin-Standardpräparationen wurden im jeweiligen Elutionspuffer (Boratpuffer I und II)

gelöst. Durch eine 1:1 Verdünnungsreihe wurden Standardkonzentrationen von 1,56 - 200 µE/ml erreicht. Alle weiteren Bedingungen waren denen unter 2.4.1. beschriebenen gleich. Da die sich dabei ergebende Standardkurve für die nach Säulenchromatographie zu bestimmenden niedrigen Insulinspiegel, die z.T. bei nur 2 µE/ml lagen, zu wenig empfindlich war, wurde versucht, durch Veränderung der Inkubationszeiten sowie der Konzentration an Antikörper, Probe und Tracer die Empfindlichkeit zu steigern.
Eine Verlängerung der Vorinkubation bis auf maximal 24 Stunden erhöhte die Empfindlichkeit der Standardkurve nicht. Auch eine Variation der Tracer-Konzentration brachte nicht den gewünschten Erfolg. Durch Verringerung der Antikörperkonzentration wurde die Standardkurve im unteren Bereich von ca. 5 bis 50 µM/ml wesentlich steiler. Die für die Experimente notwendige Empfindlichkeit wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1 : 32.000 erreicht. Gleichzeitig wurden die bei der Bestimmung zu pipettierenden Volumina geändert: 0,05 ml Antikörperlösung der Verdünnung 1 : 32.000, 0,1 ml Probe, 0,1 ml Tracer mit dem halben Gehalt an ^{125}J-Insulin wie unter 2.4.1. beschrieben. Die Inkubationszeiten wurden bei 6 Stunden Vorinkubation und anschließend 16 Stunden Inkubation bei 4°C belassen. Unter diesen Bedingungen erreichten wir die in Abb. 9 dargestellte Kurve für Insulin. Sie verlief im unteren Bereich bis etwa 25 µE/ml relativ steil, die untere Nachweisgrenze lag unter 2 µE/ml. Dieser Bereich reichte aus, um die in bis zu 4 ml Serum enthaltene Insulinmenge nach Säulenchromatographie auch bei nicht stimulierten Insulinwerten zu bestimmen.

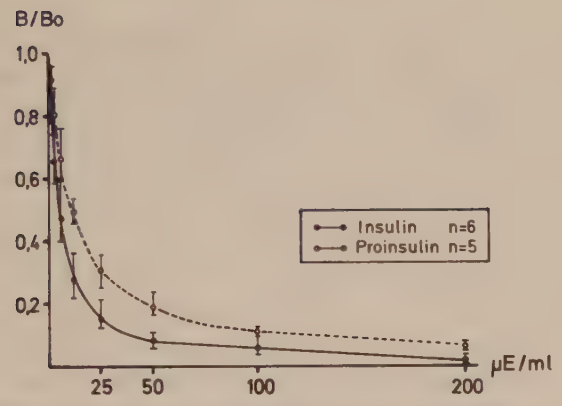


Abb. 9: Mittelwert-Standardkurven für Insulin (n = 6 -o-o-o) und Proinsulin (n = 5, - - - - - -) in Boratpuffer I mit Antikörper K 9884

2.4.2. Radioimmunologische Bestimmung von Proinsulin in Elutionspuffer nach Säulenchromatographie

Humanes Proinsulin stand nicht zur Verfügung, deshalb wurde Proinsulin vom Rind (der Firma Novo, Kopenhagen) verwendet, die erhaltenen Werte wurden in "Äquivalenz-Werten-Rinder-Proinsulin" ausgedrückt. Der Proinsulinstandard wurde wiederum im Elutionspuffer (Boratpuffer I oder II) gelöst, Antikörper und Tracer waren mit den bei der Insulinbestimmung beschriebenen Materialien identisch. Nach den unter 2.4.1. und 2.4.2. angegebenen Versuchen wurden auch Proinsulin-Standardkurven erstellt. Die benutzten Insulinantikörper K 9884 und K 2978 (Novo) zeigten eine Kreuzreaktivität mit Rinderproinsulin von 30 bis 50 % (24). Mit den unter 2.4.2. angegebenen Bedingungen (Insulin-Antikörperverhältnis 1 : 32.000, Tracer 125 Picogramm ^{125}J-Insulin/Probe, Volumenverhältnis Antikörper/Probe/Tracer von 0,05/0,1/0,1 ml) konnte eine empfindliche Standardkurve erstellt werden (Abb. 9). Diese Kurve ist im Vergleich zu der Insulinstandardkurve nach rechts verschoben, eine strenge Parallelität besteht nicht (28).

Die Empfindlichkeit der Standardkurven reichte jedoch für die geringe Proinsulinkonzentration bei basalen Seren nicht aus, eine Konzentrierung der Proinsulin-Peaks nach Säulenchromatographie wurde unumgänglich. Wie in 2.3.2.3.2. bereits beschrieben, wurde die Proinsulin-Standardreihe ausverdünnt, wie die Proben vollständig eingedampft und in 1 ml Aqua dest. aufgenommen. Zum Vergleich wurde auch eine entsprechende Insulin-Standardkurve erstellt. Die Konfiguration dieser Standardkurven unterschied sich nicht von denen ohne Konzentrierungsvorgang. Schließlich wurde das Eindampfen bei Raumtemperatur durch Gefriertrocknung (2.3.2.4.) ersetzt, die übrigen Bedingungen blieben unverändert. Abb. 10 zeigt die entsprechenden Kurven für Insulin und Proinsulin, zum Vergleich die Proinsulinkurve bei eingedampften Standards: Die Gefriertrocknung lieferte dem

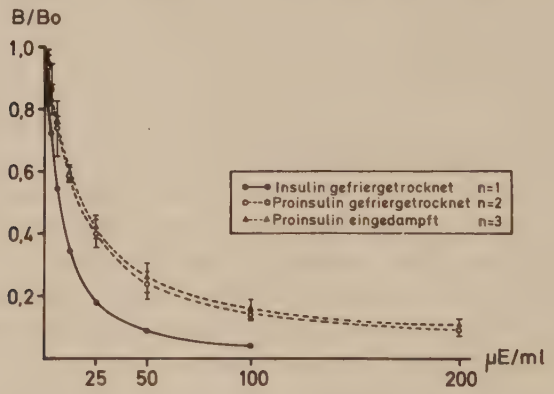


Abb. 10: Standardkurven für Proinsulin nach Eindampfen bei Zimmertemperatur, für Insulin und Proinsulin nach Gefriertrocknung jeweils in Boratpuffer II, Antikörper K 9884

Eindampfen bei Raumtemperatur identische Ergebnisse, die beiden Proinsulinkurven überlappen, sind jedoch entsprechend der geringen Antikörperaffinität zum Proinsulin gegenüber der Insulinkurve nach rechts verschoben. In Abb.11 sind Mittelwert-Standardkurven von Insulin und Proinsulin nach Gefriertrocknung der Standardlösung dargestellt: Sie verlaufen im niedrigen Bereich steil, werden ab 50 E/ml sehr flach (vgl. Abb. 9). Die untere Nachweisgrenze für Proinsulin lag im Mittel unter 4 µE/ml. Damit reicht die Empfindlichkeit aus, um auch niedrige Serum-Proinsulinwerte zu bestimmen. Die Standardkurven für Insulin und Proinsulin in Boratpuffer verliefen besonders im Bereich niedriger Konzentrationen dicht beieinander, waren jedoch berechnet mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben signifikant

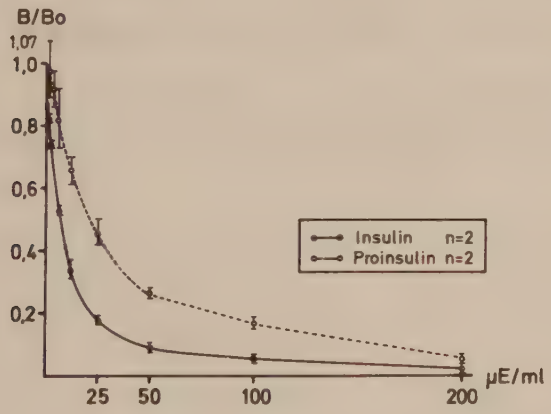


Abb. 11: Mittelwert-Standardkurven für Insulin und Proinsulin in Boratpuffer II, nach Gefriertrocknung. Antikörper K 2978.

unterschiedlich ($p \leqq 0{,}01$). Unter gleichen Bedingungen erstellte Mittelwert-Standardkurven für Insulin und Proinsulin in Boratpuffer II mit und ohne Gefriertrocknung wurden im Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verglichen. Sowohl zwischen den Insulin-Standardkurven mit und ohne Gefriertrocknung, als auch zwischen den Proinsulin-Standardkurven mit und ohne Gefriertrocknung bestand ein signifikanter Unterschied ($p \leqq 0{,}01$). Daraus folgt, daß

1. Proinsulin nicht an Insulin-Standardkurven abgelesen werden konnte, eine eigene Proinsulin-Standardkurve war zu erstellen,
2. die Proben der Proinsulin-Standardkurve mußten ebenso einer Gefriertrocknung unterzogen werden, wie die Proben nach Säulenchromatographie.

2.5. Radioimmunologische Bestimmung von hGH in Serum

Die Bestimmung des humanen Wachstumshormons wurde nach der erstmals von UTIGER et al. (43) beschriebenen und von v. WERDER (13) angegebenen Modifikation ausgeführt.

Die verwendeten Standards und Antikörper wurden bereits unter 2.1. erwähnt. hGH-Tracer wurde durch Chloramin-T-Markierung gewonnen. Trennung von freiem und gebundenem Tracer, Bestimmung und Auswertung erfolgte wie bereits unter 2.4.1. beschrieben.

2.6. Oraler Glucosetoleranztest

Aufgrund der relativ guten Aussagefähigkeit des oralen Glucosetoleranztests über die Beta-Zellfunktion (44) beschränkten wir uns auf diesen Funktionstest. Drei Tage vor dem Test wurden die Patienten kohlehydratreich ernährt (ca. 250 g Kohlehydrat/Tag). Nach ca. 12-stündigem Fasten tranken die Patienten 400 ml eines Oligosaccharidgemisches (Dextro-OGT ®), entsprechend 100 g Glucose. Vor, sowie 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Glucoseaufnahme wurden jeweils ca. 10 ml Blut aus einer antekubitalen Vene entnommen. 50 µl davon wurden zur Glucosebestimmung gegeben, das restliche Blut zentrifugiert, das Serum dekantiert und bis zur Insulin- bzw. hGH-Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

2.7. Glucosebestimmung

Glucose wurde nach der Hexokinase-Methode (8) mittels der Test-Combination Gluco-quant der Firma Boehringer GmbH, Mannheim, bestimmt.

2.8. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte wurden als arithmetisches Mittel $\pm$ SEM berechnet. Als Signifikanztest für den Vergleich verschiedener Mittelwert-Standardkurven wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Die Ergebnisse verschiedener Kollektive wurden nach dem Wilcoxon-Rangtest miteinander verglichen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Normalkollektiv

Vier Männer und vier Frauen, die klinisch vollkommen gesund waren, wurden einem oralen Glucosetoleranztest unterzogen. Nach der De Broca-Formel errechnete sich eine Abweichung von + 4,8 ± 21 % des Idealgewichts (Tab.1). Die basalen Glucosespiegel lagen bei 98 ± 3 mg/dl (n = 7), die Werte eine Stunde nach einem OGTT mit 100 g Glucose bei 124 ± 9 mg/dl (n = 8) (Tab. 1). Für Insulin ergab sich ein basaler Mittelwert von 8 ± 3 µE/ml, eine Stunde nach Stimulation von 48 ± 11 µE/ml. Die basale Proinsulinkonzentration im Serum betrug 6 ± 3 µE/ml, der stimulierte Wert 18 ± 5 µE/ml (Tab. 3). Proinsulin in Prozent IRI betrug 35 ± 5 % bzw. 28 ± 4 % (Tab. 4).

3.2. Adipositas

Wir untersuchten 6 Männer und 2 Frauen mit einem Gewicht von + 57 ± 8 % über dem Idealgewicht. Die Glucose lag bei 84 ± 8 mg/dl basal und 145 ± 11 mg/dl eine Stunde nach Glucosebelastung (Tab. 1) und war vom Normalkollektiv nicht signifikant unterschieden. Durchschnittliche Insulinwerte betrugen 11 ± 3 µE/ml basal und 75 ± 12 µE/ml nach Stimulation; Proinsulin lag bei 18 ± 6 µE/ml und 28 ± 6 µE/ml, was einem prozentualen Anteil am IRI von 50 ± 4 % und 29 ± 6 % entsprach. Auch diese Werte unterschieden sich nicht signifikant vom Normalkollektiv (p = 0,01).

PATIENT	ABWEICHUNG v.IDEAL-GEW. in %	GLUCOSE mg/dl		INSULIN				PROINSULIN			
		basal	1 Std. nach Glucose	basal		1 Std. nach Glucose		basal		1 Std. nach Glucose	
				µE/ml	%IRI	µE/ml	%IRI	µE/ml	%IRI	µE/ml	%IRI
NORMAL											
M.V. m.	+8	---	156	24	52	97	66	22	48	49	34
R.R. m.	+5	92	93	10	65	21	60	5	35	14	40
R.J. m.	±0	101	139	2	48	25	82	3	52	6	18
B.B. m.	+6	90	123	4	58	45	72	2	42	17	28
S.L. w.	+4	107	161	14	65	79	80	7	35	20	20
G.M. w.	±0	100	91	9	82	69	86	2	18	11	14
Z.R. w.	+7	90	115	3	49	28	54	3	51	24	46
M.S. w.	+8	108	139	1	80	19	78	0.2	20	6	22
Adipositas											
C.C. m.	+43	115	101	18	48	31	51	20	52	31	49
S.K. w.	+19	86	145	6	61	82	82	4	39	7	18
S.E. m.	+146	67	123	4	60	102	86	6	40	32	14
D.M. m.	+104	94	191	14	43	49	57	18	56	36	42
B.B. m.	+25	72	157	25	52	85	65	24	48	44	34
W.E. m.	+25	58	146	3	33	---	---	7	67	---	---
M.J. w.	+35	97	150	10	50	99	84	50	50	15	15

Tabelle 1: Daten vom Normalkollektiv und von Patienten mit Adipositas

m.: männlich

w.: weiblich

PATIENT	ABWEICHUNG v. IDEAL-GEW. in %	GLUCOSE mg/dl basal	GLUCOSE mg/dl 1 Std. nach Glucose	INSULIN basal µE/ml	INSULIN basal %IRI	INSULIN 1 Std. nach Glucose µE/ml	INSULIN 1 Std. nach Glucose %IRI	PROINSULIN basal µE/ml	PROINSULIN basal %IRI	PROINSULIN 1 Std. nach Glucose µE/ml	PROINSULIN 1 Std. nach Glucose %IRI	hGH ng/ml basal	hGH ng/ml 1 Std. nach Glucose
Akromegalie													
K.G. m.	+25	104	182	11	79	203	91	3	21	21	9	52.8	39.0
D.G. m.	+28	108	193	24	84	261	89	4	16	32	11	22.3	30.6
P.D. m.	+25	112	193	6	64	233	87	4	36	35	13	14.6	24.6
F.K. w.	+38	101	187	12	76	190	88	4	24	25	12	4.6	3.7
M.T. w.	+5	118	266	31	78	202	90	9	22	22	10	13.2	13.1
S.A. w.	+17	101	204	15	64	554	91	8	36	55	9	24.2	11.6
L.A. w.	+26	102	141	11	66	269	89	6	34	33	11	8.9	6.6
K.K. w.	+33	94	201	45	56	156	57	36	44	117	43	39.5	39.2
T.A. w.	+10	112	219	23	61	619	91	15	39	64	9	----	----
Insulinom													
H.H. m.	+30	40	101	11	38	1142	79	17	62	305	21	----	----
M.S. m.	+14	87	162	16	37	39	60	28	63	27	40	----	----
T.M. m.	+8	67	124	6	26	788	86	17	74	125	14	----	----
Inselzellcarcinom													
S.K. m.	+40	127	---	24	5	---	--	460	95	---	--	----	----
		133	---	10	3	---	--	342	97	---	--	----	----
		84	---	32	8	---	--	374	92	---	--	----	----

Tabelle 2: Daten von Patienten mit Akromegalie, Insulinom und Inselzellcarcinom

m.: männlich
w.: weiblich

3.3. Akromegalie

Drei männliche und 6 weibliche Patienten mit gesicherter Akromegalie wurden untersucht. Die Abweichung vom Idealgewicht betrug + 23,0 ± 3,5 %. Die hGH-Werte lagen im Mittel bei 22,6 ± 5,8 ng/ml basal und 21,3 ± 5 ng/ml eine Stunde nach Glucosebelastung (Tab. 2). Die Glucosewerte waren mit 106 ± 25 nüchtern und 198 ± 11 mg/dl eine Stunde nach Glucosebelastung deutlich erhöht, ebenso die absoluten Werte für Insulin mit basal 20 ± 4 µE/ml und 299 ± 55 µE/ml nach Stimulation. Die Proinsulinwerte lagen mit 10 ± 4 µE/ml basal und 45 ± 10 µE/ml nach Stimulation (Tab. 3) über denen des Normalkollektivs , der stimulierte meist deutlich über dem der Adipositas-Gruppe. Angesichts der hohen Insulinwerte ergaben sich Proinsulin/Insulin-Indices von 30 ± 3 % und 14 ± 4 % (Tab. 4) vor und nach Glucosestimulation. Die Werte nach Stimulation unterschieden sich signifikant vom Normalkollektiv und den Patienten mit Adipositas ($p = 0,01$).

3.4. Insulinom

Bei den drei männlichen Patienten lag die Abweichung vom Idealgewicht bei + 18 ± 7 %. Die Glucosewerte basal und eine Stunde nach Glucosegabe waren mit 65 ± 14 mg/dl und 129 ± 18 mg/dl mit dem Normalkollektiv vergleichbar (Tab.2). Diese Werte überraschten angesichts der hohen Insulinwerte von 656 ± 325 µE/ml nach Stimulation; die basalen Insulinwerte betrugen 11 ± 4 µE/ml (Tab. 3). Die Proinsulinspiegel lagen basal bei 21 ± 4 µE/ml, eine Stunde nach Stimulation bei 153 ± 81 µE/ml, was einen prozentualen Anteil am Gesamt-IRI von 66 ± 4 % und 25 ± 8 % (Tab. 4) ergibt. Wenngleich die geringe Fallzahl einen statistischen Vergleich nicht zuläßt, so zeigt sich doch für die basalen Proinsulinwerte eindeutig eine Tendenz zu hohem prozentualen Anteil; der abso-

GRUPPE		GLUCOSE mg/dl		INSULIN µE/ml		PROINSULIN µE/ml	
		basal	1 Std. nach Glucose	basal	1 Std. nach Glucose	basal	1 Std. nach Glucose
NORMAL	MW	98	124	8	48	6	18
	RANGE	90-108	91-161	1-24	19-97	0-22	6-49
n = 8	SEM	3	9	3	11	3	5
ADIPOSITAS	MW	84	145	11	75	18	28
	RANGE	58-115	101-191	3-25	31-102	4-50	7-44
n = 7	SEM	8	11	3	12	6	6
AKROMEGALIE	MW	106	198	20	299	10	45
	RANGE	94-118	141-266	6-45	156-619	3-36	21-117
n = 9	SEM	3	11	4	55	4	10
INSULINOM	MW	65	129	11	656	21	153
	RANGE	40-87	101-162	6-16	39-1142	17-28	27-305
n = 3	SEM	14	18	4	325	4	81
INSELZELL-CARCINOM	MW	115	---	22	---	392	---
	RANGE	84-133	---	10-32	---	342-460	---
n = 1	SEM	15	---	6	---	35	---

Tabelle 3: Glucose, Insulin und Proinsulin als Mittelwerte, Range und SEM der Absolutwerte aller Patientengruppen

lute Proinsulinspiegel nach Stimulation liegt hier mit 153 ± 81 µE/ml hoch, sein Anteil am Gesamt-IRI mit 25 ± 8% verbleibt im Bereich des Normalkollektivs.

GRUPPE	PROINSULIN als % Gesamt-IRI			
	basal		1 Std. nach Glucose	
	MW ± SEM	Range	MW ± SEM	Range
Normalpersonen n = 8	35 ± 5	18–52	28 ± 4	14–46
Adipositas n = 7	50 ± 4	39–67	29 ± 6	14–49
Akromegalie n = 9	30 ± 3	16–44	14 ± 4	9–43
Insulinom n = 3	66 ± 4	62–74	25 ± 8	14–40
Inselzellcarcinom n = 1	95 ± 2	92–97	—	—

Tabelle 4: Prozentualer Anteil des Proinsulins am gesamten immunoreaktiven Insulin (Gesamt-IRI)

3.5. Inselzellcarcinom

Entsprechend der Seltenheit dieses Krankheitsbildes konnten wir nur Serum von einem Patienten analysieren. Ein Inselzellcarcinom war histologisch gesichert. Es handelte sich um einen männlichen Patienten mit einer Abweichung vom Idealgewicht von + 40%. Wir haben drei basale Bestimmungen vorgenommen (Tab. 2). Die Glucosespiegel lagen bei 115 ± 15 mg/dl. Die Insulinwerte waren mit 22 ± 6 µE/ml

erhöht; Proinsulin war mit 392 ± 35 µE/ml stark erhöht, was einem mittleren Anteil von 95 ± 2% (Tab. 4) am Gesamt-IRI entsprach. Auch hier überraschten realativ hohe Glucosespiegel bei Hyperinsulinämie, besser bei einem hohen Gesamt-IRI. Zur Erklärung trägt der hohe Proinsulinanteil bei, da Proinsulin eine geringe biologische Aktivität besitzt. Wahrscheinlich handelt es sich um Proinsulinlike Material, das vom Inselzellcarcinom gebildet wird und das möglicherweise eine noch geringere biologische Aktivität besitzt, immunologisch sich jedoch wie Proinsulin verhält. Eindeutig sind hier die hohen basalen Proinsulinanteile im Vergleich zu den anderen Kollektiven, was sich möglicherweise in differentialdiagnostischer Hinsicht für das Inselzellcarcinom verwenden läßt. Weitere Untersuchungen von Inselzellcarcinom-Patienten sind notwendig; in der Literatur wurden vergleichbare Werte beschrieben (21, 30, 32).

4. DISKUSSION

4.1. Proinsulinbestimmung in Serum

Die Trennung mittels Bio-Gel P-30 und 3 M Essigsäure zeigte gute, brauchbare Ergebnisse. Bio-Gel P-30 wurde während der Initialphase der Proinsulinforschung von der Gruppe von STEINER und RUBENSTEIN (10, 45, 46) wegen seiner besseren Trennungseigenschaften bevorzugt, wenngleich Essigsäure mit einem pH bei 1,9 - 2,2 die radioimmunologische Bestimmung störte. Dieses Faktum wurde durch Lyophilisieren der Proben und anschließende Wiederaufnahme in 0,1 molarem albuminhaltigem Tris- oder Boratpuffer umgangen (4, 10). Zugleich bedeutete dieser Schritt eine Konzentrierung um den Faktor 2,2. In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen löste sich der Niederschlag der Essigsäure mit Albumin jedoch weder in Tris-Puffer noch in Boratpuffer, es bildete sich eine farblose Grenzschicht, die sich auch nach stundenlangem Rühren nicht löste. Essigsäurerückstand ohne Albumin löste sich rasch, damit war jedoch eine Trennung nicht möglich. Das zeigte, daß in dem sauren Milieu das Albuminmolekül verändert worden war (21). In späteren Versuchen hielten zwar STEINER und RUBENSTEIN am Bio-Gel fest, eluierten jedoch mit Boratpuffer bei pH 8 (10, 26, 47, 48), wobei auf eine Konzentrierung mittels Lyophilisierung verzichtet wurde. Dieser Versuch scheiterte an der extrem langsamen Fließgeschwindigkeit bei der Chromatographie.

Die gleichen Probleme, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, traten bei der Säulenchromatographie

mittels Sephadex G-50 Superfine und 1 M Essigsäure auf. Bei entsprechender Qualität der Trennung wie mit Bio-Gel (49) störte das saure Milieu die radioimmunologische Bestimmung, ein Lyophilisieren mißlang wegen der schlechten Löslichkeit des Rückstandes. Dieses Problem konnte jedoch gelöst werden, indem Sephadex G-50 Superfine-Säulen mit 130 mM Boratpuffer eluiert wurden. Die Trennung stand der mit Essigsäure nicht nach, außerdem konnte mit diesem Puffer im Radioimmunoassay gearbeitet werden. Die gleichen Resultate lieferte 50 mM Boratpuffer, der sich besser zur anschließenden Konzentrierung eignete.

Damit war eine brauchbare Alternative zu den von verschiedenen Autoren beschriebenen Versuchen mit Barbital-Albumin-Puffer bei pH 8,6 (16) oder Amoniumbicarbonat-Puffer bei gleichem pH-Wert (9, 14, 60) gefunden. Wenngleich die Ergebnisse der Trennung nicht besser waren, verdrängten sie die initial häufig beschriebene Methode mittels 1 M Essigsäure (2, 4, 10, 32), die GUTMAN (43) in seiner Arbeit zugunsten der Trennung mit Veronal-Puffer bei pH 8,6 verließ. Die oben genannten Autoren verwendeten meist Säulen der Länge von 40 bis 60 cm und nahmen Fließgeschwindigkeiten von 2 bis 3 ml pro Stunde in Kauf (10). Dabei bestand dann ein Überlappen der Peaks. Durch eine Verlängerung der Säule auf 100 cm wurde eine bessere Trennung erreicht, die eine Überlappung nahezu ausschloß.

LAZARUS (32) berichtete über Versuche mit Säulen der Dimension 2 x 160 cm. Eine gewünschte Auftrennung der PLM-Fraktion in ihre verschiedenen Spaltprodukte war damit noch nicht möglich.

Die ohnehin niedrigen Insulin- und Proinsulinwerte in Seren unter Basalbedingungen eluierten in wenigstens acht Fraktionen, von denen nur die Spitzenwerte deutlich die untere Nachweisgrenze des Radioimmunoassay übertrafen. Durch das Sammeln der ganzen Peaks in einer Fraktion mit nachfolgender Konzentrierung von 5:1 lag der Wert für Proinsulin im empfindlichen Bereich der Standardkurve. Die notwendige Konzentrierung nach Säulenchromatographie wurde mittels Molekularfiltration durchgeführt, wobei eine Wiederfinderate von 63 - 100 % für Proinsulin und 70-100 % für Insulin erreicht wurde; sechs Proben konnten gleichzeitig bearbeitet werden. Die Wiederfinderate konnte mittels Gefriertrocknung erhöht werden; gleichzeitig konnten mehr als fünfzig Proben verarbeitet werden. Die Standardproben wurden in gleicher Weise behandelt. Die von uns erarbeiteten Ergebnisse stimmen mit denen von GORDON (9) weitgehend überein.

Die radioimmunologische Bestimmung des gesamten IRI im Serum sowie des Insulin- und Proinsulin-Peaks erfolgte in der Regel mittels im Meerschweinchen gebildetem Antikörper gegen humanes oder Schweineinsulin nach der Methode von HALES und RANDLE (40). Dabei traten zwischen den Antikörperchargen sowie auch speziesspezifisch z.T. erhebliche Unterschiede in der Affinität der Hormone zum Antikörper auf (28). Die gleiche Antikörpercharge wurde deshalb für sämtliche Bestimmungen benutzt. Von vielen Autoren wurde für die Bestimmung des Proinsulins, des Insulins sowie des gesamten immunoreaktiven Insulins im Serum humaner Insulinstandard (16, 26, 32), Proinsulinstandard vom Schwein (9, 14, 16, 51) oder Rind (24, 28) benutzt. Dabei wurde die geringe Affinität des Proinsulinmoleküls zum Insulinanti-

körper von ca. 15 - 50 %in Kauf genommen, was jedoch zu falsch niedrigen Proinsulinwerten führte. Auf einen Korrekturfaktor wurde in der Literatur häufig verzichtet (9, 32, 35, 52). Dieser Fehler ließ sich nur durch Einbeziehung eines humanen Proinsulinstandards eliminieren. Humanes Proinsulin stand jedoch zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung nicht zur Verfügung (46, 53, 54, 55). Deshalb wurde in dieser Studie Proinsulin vom Rind als Proinsulinstandard benutzt. In ihrem immunologischen Verhalten unterschieden sich die verschiedenen tierischen Proinsulinarten insgesamt wenig, entsprechende Standardkurven überlappen, z. T. trat Überschneidung ein. Deutlich differierten sie zu Insulinstandardkurven verschiedener Spezies, deren Emfpindlichkeit sie nur zu einem Bruchteil erreichten; die Insulinstandardkurven dagegen unterschieden sich untereinander gering (24, 27).
Wenngleich bei einigen Autoren humane Proinsulinstandards verwendet wurden, so bleibt eine nicht unerhebliche Fehlerquelle in der Berechnung des prozentualen Proinsulinanteils am Gesamt-IRI nach der Formel

$$\%\text{-Proinsulin} = \frac{\text{Proinsulinwert}}{\text{Gesamt-IRI}} \times 100\ \%.$$

Bei der Bestimmung des Gesamt-IRI wurde der Proinsulinanteil an der Insulinkurve falsch niedrig abgelesen, so daß zwangsläufig das Gesamt-IRI niedriger ist als die Summe von Insulin und Proinsulin. Dies ist in der Praxis bei niedrigen Proinsulinanteilen zu vernachlässigen. Der exaktere prozentuale Proinsulinanteil sollte nach separaten Bestimmungen von Insulin und Proinsulin nach folgender Formel errechnet werden:

$$\%\text{-Proinsulin} = \frac{\text{Proinsulin}}{\text{Proinsulin + Insulin}} \times 100\ \%.$$

Etwas höhere Werte für Proinsulin lieferte die von MELANIE (45) und KITABCHI (33) u.a. (51, 57) veröffentlichte Methode, die Proinsulin nach Abbau von Insulin mittels einer Rattenmuskel-Protease bestimmt. Die Proteolyse von Insulin ist mit dieser Methode jedoch unvollständig. Darüber hinaus wurde Proinsulin partiell abgebaut (21). In verschiedenen Seren von Insulinompatienten konnten ausserdem Protease-inhibierende Faktoren nachgewiesen werden, die zu ebenso falsch erhöhten Werten führten (35). Diese Fehlermöglichkeiten stellten die Vorzüge dieser Methode in Form von geringen Serummengen sowie guter Praktikabilität in Frage.

Zwischenzeitlich wurde eine elegante Methode der direkten Proinsulinbestimmung von HEDING (11) beschrieben, später von RAINBOW (54) eine davon etwas unterschiedene Methode. Dabei wird Proinsulin im Serum durch an Sepharose gebundene Insulin antikörper adsorbiert, nach Entfernen von C-Peptid wird Proinsulin im C-Peptid-Assay bestimmt. Beide sind für Proinsulin spezifisch, sehr sensibel (untere Nachweisgrenze bei 0,6 µE/ml) und praktikabel. Diese Methoden in die Routineanwendung umzusetzen bedarf jedoch weiterer Arbeit.

4.2. Bestimmung der basalen und durch orale Glucose stimulierten Insulin- und Proinsulinwerte bei Patientenkollektiven

Das im rauhen endoplasmatischen Reticulum gebildete Proinsulin wird zum Golgi-Apparat transportiert;dort bilden sich sogenannte Sekretgranula, in denen die proteolytische

Spaltung von Proinsulin zu Insulin abläuft (58). Auf Stimulation vorwiegend mittels Glucose, wobei das cyclo-AMP eine Mediatorrolle spielt, entleeren die Sekretgranula Insulin, C-Peptid und noch nicht gespaltenes Proinsulin ins Blut. Die B-Zelle hat einen Proinsulinanteil von 3 % am Gesamt-IRI (59).

Im Nüchternserum lag der von uns bestimmte Proinsulin-Anteil zwischen 18 % und 52 % (MW $\pm$ SEM, 35 $\pm$ 5 %), was mit den in der Literatur angegebenen Werten von 5 - 48 % übereinstimmt (9, 21). Nach Stimulation wurde in der Pfortader ein ähnliches Verhältnis von Proinsulin und Insulin gemessen wie es in der ß-Zelle vorkommt (47). Der hohe Proinsulinanteil im Nüchternserum ist auf die dreifach längere Halbwertszeit des Proinsulins zurückzuführen, die wiederum durch die geringe Abbaurate in der Leber und nur teilweise Ausscheidung durch die Nieren bedingt ist (35, 60, 61). Bei Stimulation im OGTT steigt der Insulinspiegel um den Faktor 6 an, der des Proinsulins im Vergleich nur ca. dreifach, was zu einer prozentualen Abnahme an Proinsulin führt (MW $\pm$ SEM 28 $\pm$ 4 %, Bereich 14 - 46 %). Die Werte des Normalkollektivs lagen bei HEDING (11) - methodisch bedingt - basal im Mittel bei 19 % (RANGE 6 - 34 %) und nach Stimulation bei 8 % (Bereich 3 - 20 %) deutlich niedriger. Höhere Werte ergab die simultan zur Gelfiltrationsmethode verlaufende enzymatische Bestimmung (35), die bei Normalpatienten Werte zwischen 0 und 72 % erreichte.

Die Insulinsynthese und -sekretion läuft wie bei gesunden auch bei Patienten mit Adipositas oder Akromegalie ab, bei denen eine zum Teil exzessive Hyperinsulinämie vorliegt.

Die Ursache ist teilweise durch eine periphere Insulinresistenz bedingt. Diese Insulinresistenz führt häufig zur Glucoseintoleranz (21).

Entsprechend dem ungestörten Sekretionsmechanismus werden auch im Mittel höhere Proinsulinkonzentrationen ans Blut abgegeben, so daß der prozentuale Proinsulinanteil bei diesen Patienten wie im Normalkollektiv erhalten bleibt. Diese Resultate wurden durch eine Anzahl von Autoren beschrieben (9, 10, 52, 62). Daraus schloß GORDON (53), daß die ans Serum abgegebene Form von Insulin oder Proinsulin an der gestörten Glucosetoleranz oder der Insulinresistenz dieser Krankheitsbilder keine Rolle spielt.
Die hier bestimmten Proinsulinwerte für das Patientenkollektiv Adipositas mit 50 $\pm$ 4 % (Range 39 - 67 %) basal und 29 $\pm$ 6 % (Range 14 - 49 %) nach Stimulation bestätigen diese Aussagen ebenso wie die bei akromegalen Patienten gemessenen basalen Proinsulinanteile mit 30 $\pm$ 3 % (Range 16 - 44 %). Im Gegensatz dazu stehen die hier relativ niedrigen Proinsulinwerte von 14 $\pm$ 4 % (Range 9 - 43 %) nach Stimulation der Akromegalen im OGTT. Sie unterscheiden sich signifikant vom Normalkollektiv und der Patientengruppe mit Adipositas. SCHATZ et al. (63) konnten 1973 an hypophysektomierten Ratten eine Verbesserung der Insulinsynthese und insbesondere der -Sekretion nach Langzeitgabe von Wachstumshormon zeigen. Versuche in vitro an isolierten Pankreasinseln von ebenso hypophysektomierten Ratten, die kurzfristig mit Wachstumshormon inkubiert wurden, verliefen negativ. Eine Verbesserung der endocrinen Pankreasfunktion konnten ÅKERBLOM et al. an Ratten demonstrieren, in denen experimentell Wachstumshormon sezernierende Tumoren

erzeugt worden waren (64). Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß Wachstumshormon neben der peripheren, insulinantagonistischen Wirkung an der Langzeitregulation der Funktion der ß-Zellen des Pankreas beteiligt ist.

LAZARUS und Mitarbeiter (65) stellten als eine der ersten Gruppen den hohen Proinsulinanteil bei Patienten mit insulinsezernierenden Tumoren heraus. Eine Reihe weiterer Autoren (17, 21, 52) bestätigten dies. Der von den Autoren angegebene Bereich für Nüchtern-Proinsulinwerte reichte extrem weit von 3 - 85 %. Inselzellcarcinome gehen häufiger mit erhöhten Werten einher: SCHEIN (17) berichtete über elf Fälle bei einem Kollektiv von zwölf Patienten. Die in dieser Arbeit untersuchten Insulinom-Patienten (n = 3) zeigten normale basale Insulinwerte (11 $\pm$ 4 µE/ml) bei erhöhten basalen Proinsulinwerten (21 $\pm$ 4 µE/ml), was einen erhöhten Proinsulinanteil von 66 % (Bereich 62 - 74 %) am totalen IRI bedeutete. Der basale Blutzuckermittelwert lag mit 65 mg% im unteren Normbereich. Nach Stimulation stieg das Seruminsulin exzessiv an (656 $\pm$ 325 µE/ml), weniger das Proinsulin (153 $\pm$ 81 µE/ml); der Proinsulinanteil lag mit 25 $\pm$ 8 % nach Stimulation im Bereich der übrigen Kollektive. Ein Patient mit histologisch gesichertem Inselzellcarcinom zeigte basale Proinsulinanteile von 95 $\pm$ 2 % (92 - 97 %) bei einem absoluten Proinsulinwert von im Mittel 392 $\pm$ 35 µE/ml. Verantwortlich für die hohen basalen Proinsulinanteile bei Patienten mit Inselzelltumoren ist ein Defekt in der Ausbildung der Sekretgranula, in denen die Spaltung des Proinsulins zu Insulin erfolgt, so daß vermehrt Proinsulin ins Blut abgegeben wird (53, 65). TRACK u.a. (66) haben gezeigt, daß

degranulierte Inselzellen von Ratten einen wesentlich höheren Prozentsatz an Proinsulin sezernieren als granulierte Zellen bei accelerierter Synthese von Proinsulin.

4.3. Wert der Proinsulinbestimmung im Serum bezüglich Diagnostik eines Insulinoms respektive eines Inselzellcarcinoms

Die simultane Bestimmung von hohem immunoreaktiven Serum-insulin (IRI) und Hypoglycämie nach Fasten spricht für ein Insulinom (67, 68). Diese Konstellation ist jedoch höchstens bei 50 % des Kollektivs nachweisbar. Die Bestimmung des Proinsulinanteils im Serum, der bei Insulinomen bis zu 85 % am gesamten IRI erreichen kann (31), bietet sich als diagnostische Hilfe an. Die Proinsulinbestimmung ist jedoch nicht als absolutes Kriterium zu verwenden, da bis zu 50 % des Insulinompatienten normale Nüchternproinsulinwerte zeigen. Keine Bedeutung kommt dabei den Proinsulinanteilen nach Stimulation im OGTT zu, unterschieden sie sich doch nicht vom Normalkollektiv. Inselzellcarcinome haben häufiger extrem hohe Werte, wie von SCHEIN (17) bei elf von zwölf Patienten mit Inselzellcarcinom beschrieben wurde.

Die Höhe der mittels Radioimmunoassay gemessenen Proinsulinwerte korreliert nicht immer mit der Höhe der Blutzuckerspiegel. Patienten mit derartigen Krankheitsbildern können trotz niedriger Insulinwerte und mäßig erhöhter Proinsulinwerte eine Fastenhypoglycämie aufweisen, da diese Tumoren nicht selten proinsulinähnliche Zwischenprodukte von hoher biologischer Aktivität produzieren (65).

Andererseits bewirken hohe Proinsulinspiegel nicht immer eine Hypoglykämie, wenn Proinsulin von geringer biologischer Aktivität vorliegt (70).

Die Diagnostik eines Insulinoms mittels IRI kann dadurch erschwert werden, daß verschiedene Insulin-Antikörper in verschiedenem Ausmaß mit Proinsulin kreuzreagieren. Der Proinsulinanteil, mehr oder weniger biologisch aktiv und damit für die Hypoglykämie mitverantwortlich, kann dadurch falsch niedrig eingeschätzt werden (71). Die separate Bestimmung von Insulin und Proinsulin im Nüchternserum ergibt dann eine weitere Differenzierungsmöglichkeit. Stark erhöhte Proinsulinanteile sprechen eher für Inselzellcarcinome (31, 53), die Treffsicherheit ist hier ungleich höher.

TURNER und HEDING (72) veröffentlichten 1977 eine Studie über Insulinompatienten und stellten dabei die Überlegenheit der Proinsulinbestimmung im Serum nach eintägigem Fasten heraus. Bei allen der 15 untersuchten Insulinompatienten waren Proinsulinspiegel zu finden, die mindestens die vierfache Höhe des Normalkollektivs zeigten, unabhängig von Plasmaglucosewerten. Gleichzeitig beschrieben sie einen Suppressionstest, nach dem Insulinome noch sicherer diagnostiziert werden können. Unter Suppression mittels Fischinsulin oder Insulin vom Schwein oder Rind fällt bei Normalpersonen der Insulinspiegel, gemessen über den Serum-C-Peptid-Spiegel, ab. Bei Insulinompatienten bleibt die Sekretion von Insulin und Proinsulin unverändert.

Darüber hinaus läßt sich die Proinsulinbestimmung zur Verlaufskontrolle insulinproduzierender Tumoren verwenden. Steigt nach Therapie der Proinsulinspiegel an (73), so ist Tumorgewebe noch vorhanden oder wieder aktiv.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung von Proinsulin im Serum erfordert - bedingt durch die Kreuzreaktivität von Insulin und Proinsulin - eine Separation beider Hormone. Die Trennung wurde mittels Säulenchromatographie mit Bio-Gel P-30 und Sephadex G-50 Superfine erreicht. Boratpuffer erwies sich als geeigneter Elutionspuffer. Mit diesem war Sephadex G-50 Superfine eindeutig überlegen. Eine Verlängerung der Säulenlänge auf 100 cm beseitigt die Überlappung beider Peaks. Da auch nach Auftragen des maximalen Serumvolumens von 4 ml die Proinsulinwerte noch häufig unter der Nachweisgrenze des RIA lagen, wurden 10 ml-Fraktionen gesammelt und mittels Gefriertrocknung konzentriert. Die Proben der Standardkurve wurden in gleicher Weise konzentriert. Beide Hormone wurden radioimmunologisch bestimmt, wobei ein humanes Insulin und ein bovines Proinsulin als Standard dienten, da für Proinsulin keine humane Präparation zur Verfügung stand.

Die basalen Proinsulinwerte eines Normalkollektivs lagen bei 35 $\pm$ 5 % des Gesamt-IRI, nach oraler Glucose-Stimulation stiegen die Insulinspiegel im Serum stärker an als die Proinsulinspiegel, so daß der Proinsulinspiegel am Gesamt-IRI nur noch 28 $\pm$ 4 % war. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied im Proinsulinanteil zwischen Normalkollektiv und dem Patientenkollektiv mit Adipositas. Hingegen lagen bei Patienten mit Akromegalie die prozentualen Proinsulinwerte nach Stimulation statistisch niedriger, bedingt durch den hohen Insulinanstieg. Anders verhielt es sich bei Patienten mit organischem Hyperinsulinismus. Hier wurden

Proinsulinanteile am Gesamt-IRI basal von 62 - 91 % und nach Stimulation von 14 - 40 % gemssen. Proinsulin besitzt daher eine hohe diagnostische Bedeutung beim organischen Hyperinsulinismus.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BANTING, F. G., C. H. BEST
   Internal secretion of pancreas
   J. Lab. Clin. 7, 251 (1922)

2. STEINER, D. F., D.CUNNINGHAM, L. SPIGELMANN, B.ATEN
   Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor
   Science 157, 697-700 (1967)

3. CHANCE R. E., R. M. ELLIS, W. W. BROMER
   Porcine proinsulin: Characterisation and amino acid sequence
   Science 161, 165-167 (1968)

4. OYER, P. D., S. CHO, J.D. PETERSON, D. F. STEINER
   Studies on human proinsulin
   Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic c-peptide
   J. Biol.Chem. 246, 1375-1386 (1971)

5. YALOW, R. S, S. H. BERSON
   Big, Big Insulin
   Metabolism Vol. 22, 7o3-713 (1973)

6. GORDON, P., J. ROTH
   Plasma insulin: Fluctuation in the "big" insulin component in man after glucose and other stimuli
   J. Clin, Invest. 48, 2225-2234 (1969)

7. RUBENSTEIN A. H., S. CHO, D. F. STEINER
   Evidence for proinsulin in human urine and serum
   Lancet 6, 1353-1353 (1968)

8. SCHMIDT, F. H.
   Methoden der Harn- und Blutzuckerbestimmung
   Klin.Wschr. 39, 1246 (1961)

9. GORDON, P., B. SHERMAN, J. ROTH
   Proinsulin like component of circulating insulin in the basal state and in patients and hamsters with islet cell tumors
   J. Clin. Invest. 5O, 2113-2121 (1971)

10. MELANI, F., A. H. RUBENSTEIN, D. F. STEINER
    Human Serum Proinsulin
    J. Clin. Invest. Vol. 49, 497-507 (1970)

11. HEDING, L. G.
Specific and direct radioimmunoassay of human proinsulin in serum
Diabetologia 13, 467-474 (1977)

12. PHELPS, R. J., R. BERGENTAL, N. TREINKEL, A. H. RUBENSTEIN, B. E. METZGER, N. UNKO
Relationship between plasma insulin and proinsulin during late pregnancy in normal and diabetic subjects.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 1092-1097 (1975)

13. WERDER, von, K.
Wachstumshormone und Prolaktin-Sekretion des Menschen
Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Heidelberg (1975)

14. GORDON, P., C. M. HENDRICKS, J. ROTH
Circulating proinsulin like component in man: Increased proportion in hypoinsulinaemic states
Diabetologia 10, 469-474 (1974)

15. Lazarus, N. K., T. TANESE, R. GUTMAN, K. RECANT
Synthesis and release of proinsulin and insulin by human insulinoma tissue
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 273-281 (1970)

16. ALSEVER, R. N., M. R. STJERNHOLM, K. G. SUSSMAN, A. H. RUBENSTEIN
Clinical correlations of serum proinsulin like material in islet cell tumors
Diabetologia 12, 527-530 (1976)

17. SCHEIN, P. S., R. A. PELELLIS, C. R. KAHN, P. GORDON, A. R. KRAFT
Islet cell tumors: Current concepts and management
Ann. Intern. Med. 79, 239-257 (1973)

18. KANAZAWA, Y., M. HAYASHI
Familial proinsulinemia: a possible cause of abnormal glucose tolerance
Diabetes 28, Abs. 108 (1979)

19. GABBAY, K. H., K. de LUCA, I. N. FISHER, M. F. MAKO, A. H. RUBENSTEIN
Familial hyperinsulinaemia: an autosomal dominant defect
N. Engl. J. Med. 294, 911-915 (1976)

20. GIVEN, B. D., M. F. MAKO
Diabetes due to secretion on an abnormal insulin
N. Engl. J. Med. 302, Nr. 3, 129-135 (1980)

21. KITABCHI, A. E.
Proinsulin and C-peptide: a review
Metabolism 26, Nr. 5 (1977)

22. KITABCHI, A. E., W. C. DUCKWORTH, B. BENSON
In vivo effects of insulin and proinsulin on diaphragm and epididymal fat pads in rats
Diabetes 21, 335 - 338 (1972)

23. STEINER, D. F., W. KEMMLER, J. L. CLARK, P. E. OYER, A. H. RUBENSTEIN
The biosynthesis of insulin
Handbook of Physiology and Endocrinology I, Chapter 10

24. KITABCHI, A. E.
The biological and immunological properties of pork and beef insulin, proinsulin and connecting peptides
J. Clin. Invest. 49, 979-987 (1970)

25. FREYCHET, P.
The interactions of proinsulin with insulin receptors on the plasma membrane of the liver
J. Clin. Invest. 54, 1020 - 1031 (1974)

26. STARR, J., A. H. RUBENSTEIN
Metabolism of endogenous proinsulin and insulin in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 305-308 (1974)

27. STARR, J. D., A. H. RUBENSTEIN
Measurement of serum proinsulin lika material: crossreactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay
J. Lab. Clin. Med. 91, 683-692 (1978)

28. KITABCHI, A. E., W. C. DUCKWORTH, F. B. STENZ, S.S.YU
Properties of proinsulin and related polypeptides. in: Harts, R. (ed): CRC Critical Reviews in Biochemistry, Cleveland Chemical Rubber Company pp. 55-94 (1972)

29. CREUTZFELDT, C., N. S. TREUCH, W. CREUTZFELDT
In vitro studies of the rate of proinsulin and insulin turnover in seven human insulinomas
Europ. J. Clin. Invest. 3, 371-384 (1973)

30. SCHLICHTKRULL, J., J. BRAGE, H. EGE, O. HALLUND, L. G. HEDING u.a.
Proinsulin and related Proteins
Lecture held at the 5th Annual Meeting of the Europ. Association f. the Study of Diabetes, Montpellier (1969)

31. HEDING, L. G.
Radioimmunological determination of human c-peptide in serum
Diabetologia 11, 541-548 (1975)

32. LAZARUS, N. R., R. A. GUTMAN, J. C. PENHOS, L. RECANT
Biologically active circulating proinsulin like material from an islet cell carcinoma patient
Diabetologia 8, 131-135 (1972)

33. KITABCHI, A. E., W. C. DUCKWORTH, J. S. BRUSH, M. HEINEMANN
Direct measurement of proinsulin in human plasma by the use of an insulin degrading encyme
J. Clin. Invest. 50, 1792-1799 (1971)

34. DUCKWORTH, W. C., M. D. ABBAI, A. E. KITABCHI, M. HEINEMANN
Direct measurement of plasma proinsulin in normal and diabetic subjects
Acn. J. of Med. 53, 418, 427 (1972)

35. CRESTO, J. C., R. L. LAVINE, G. FING, L. RECANT
Plasma proinsulin. Comparison of insulin spezific protease and gel filtration assays
Diabetes 23/6 , 505-511 (1974)

36. FRANK, B.
Persönliche Mitteilungen (1982)

37. DAVOREN, P. R.
The isolation of insulin from a single cat pancreas
Biochem. Biophys. Acta 63, 150 (1962)

38. HEDING, L. G.
Radioimmunological determination of pancreatic and gut glucagon in plasma
Diabetologia 7, 10-19 (1971)

39. YALOW, R. S., S. H. BERSON
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)

40. HALES, C. N., P. J. RANDLE
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate
Biochem. J. 88, 137-146 (1963)

41. BOTTERMANN, P., R. ERMLER, J. HENNER
A semiautomatic method for immunoassay of insulin and human growth hormone
Horm. Metab. Res. 3, 55 (1971)

42. MARSCHNER, I., F. ERHARDT, P. C. SCRIBA
Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline function"
IAEA 1, 111-122 (1974)

43. UTIGER, R. D., M. L. PORKER, W. H. DAUGHADAL
Studies on human growth hormone
A radioimmunoassay for human growth hormone
J. Clin. Invest. 4, 254 (1962)

44. FÖRSTER, H.
Laboratoriumsuntersuchungen beim Diabetes mellitus
in: Mehnert H. u. K., Schöffling
Diabetologie in Klinik und Praxis, 112
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

45. MELANI, F., A. H. RUBENSTEIN, P. E. OYER
Identification of proinsulin and c-peptide in human serum by a specific immunoassay
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 148-155 (1970)

46. MELANI, F. M., W. G. RYAN, A. H. RUBENSTEIN, D. F. STEINER
Proinsulin secretion by a pancreati beta cell adenoma
New Engl.J.of Med. 283, No.14, 713-719 (1970)

47. HARWITZ, D. L., J. STARR, M. F. MAKO, W. G.BLACKARD, A. H. RUBENSTEIN
Proinsulin, insulin and c-peptide concentrations in human portal and peripheral blood
J. Clin. Invest. 55, 1278-1283 (1975)

48. ROSENBLOOM, A. E., J. STARR, A. H. RUBENSTEIN
Serum proinsulin in children and adolescents with chemical diabetes
Diabetes 24, 108, 753-757 (1975)

49. GUTMAN, P. A., G. FING, J. R. SCHAPIRO, H. SELAWOY, L. RECANT
Proinsulin and insulin release with a human insulinoma and adjacent nonadenomatous pancreas
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 978 (1973)

50. KÜHL, C. K.
Serum proinsulin in normal and gastational pregnancy
Diabetologia 12, 255-300 (1976)

51. BURGHEN, G. H., J. N. ETTELDORF, R. L. TROUY, A. E. KITABCHI
Insulin and proinsulin in normal and chemical diabetic children
The J. of Pediatrics89, No. 1, 48-53 (1976)

52. SHERMAN, B. U., S. PELA, S. S. FAJANS, J. C. FLOYD, J. W. CONN
Plasma proinsulin in patients with functioning pancreatic islet cell tumors
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, No 2, 271-280 (1972)

53. GORDON, P., J. ROTH, C. M. HENDRICKS, C. R. KAHN
Plasma proinsulin like components
Israel J. Med. Sci. 10, No 10 (10/74)

54. RAINBOW, S. J., J. S. WOODHEAD, A. K. YUE, S. D. LUZIO, C. N. HALES
Measurement of human proinsulin by an indirect two site immunoradiometric assay
Diabetologia 17, 229-234 (1979)

55. STARR, J., A. H. RUBENSTEIN
Metabolism of endogenous proinsulin and insulin in man
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38, No 2, 305-308 (1974)

56. GORDON, P., J. ROTH, P. FREYCHET, R. KAHN
The circulating proinsulin like components
Diebates 21 (Suppl. 2) 673-677 (1972)

57. MICHAELIS, P., J. NEUMANN, B. SCHULZ, W. NOWAK W. KÖDER, R. MICHAEL, P. HEINKE, R. REDING
Relationen zwischen portal- und peripher-venöser Insulin- und Proinsulinkonzentration unter Glucoseinfusion beim Menschen
Endokrinologie 64, 3, 257-268 (1975)

58. SCERSON, R. L., N. W. STEFFES, A. W. LINDALL
Subcellular localisation of proinsulin to insulin conversion in isolated rat islets
Endocrinol. 86, 88-96 (1970)

59. HEDING, L. G., U. D. LARSEN, J. MARKUSSEN, K. H. JÜRGENSEN, O. HALLUND
Radioimmunoassay for human, pork and ox c-peptides and related substances

60. TOCCAFONDI, R., C. N. ROTELLA, A. TANINI, P. ARCANGELI
Plasma proinsulin like component and insulin in chronic liver disease
Horm. Metab. Res. 9, 101-105 (1977)

61. KATZ, A. J., A. H. RUBENSTEIN
Metabolism of proinsulin, insulin and c-peptide in the rat
J. Clin. Invest. 52, 1131-1121 (1973)

62. GUTMAN, R. A., N. R. LAZARUS, J. C. PERKES, S. FAJANS, L. RECANT
Circulating proinsulin like material in patients with functioning insulinomas
N. Engl. J. Med. 284, 1003 (1971)

63. SCHATZ, H., V. MAIER, M. HINZ, M. SCHLAPP, E. NICOLE, E. F. PFEIFFER
Hypophysis and function of pancreatic islets
Horm. Metab. Res. 5, 29-33 (1973)

64. ÅKERBLOM, H. K., J. M. MARTIN, G. L. GARY, M.MOSCARELLO
Experimental hypersomatotropism
II. Metabolic effects in rats bearing the MAT-W 15 tumor
Horm. Metab. Res. 4, 15-21 (1972)

65. MAKO, M. E., J. STARR, A. H. RUBENSTEIN
circulating proinsulin in patients with maturity onset diabetes
Am. J. Med. 63, 865-569 (1977)

66. TRACK, M. S., H. FRERICHS, W. CREUTZFELDT
Release of newly synthesiced proinsulin and insulin from granulated and degranulated isolated rat pancreatic islets. The effect of high clucose concentrations
Horm. Metab. Res. 5, 97-103 (1976)

67. MARKS, V.
Progress report: diagnosis of insulinomas
Gat. 12, 835-843 (1971)

68. GRUNT, J. A., A. PALLOTTA, J. S. SOELDNER
Blood sugar, serum insulin and free fatty acid interrelationship during intravenous tolbutamide testing in normal young adults and in patients with insulinomas
Diabetes 19, 122-126 (1970)

69. TOMPKINS, C. V., D. BRANDENBURG, R. H. JONES, P. C. SÖNKSEN
Mechanism of action of insulin and insulin analogues
Diabetologia 20, 94-101 (1981)

70. LANDGRAF, R., M.M.C. LANDGRAF-LEURS, R. WIRSCHING, F. SPELSBERG
Diagnostische Problematik beim organischen Hyperinsulinismus
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 86, 997-1000 (1980)

71. AISEYER, R. U., J. P. ROBERTS, J. G. GERBER, N.E. WANO, A. H. RUBENSTEIN
Insulinoma with low circulating insulin levels: the diagnostic value of proinsulin measurements
Annals of Internal Medicine 82, 347-350 (1975)

72. TURNER, R. C., L. G. HEDING
Plasma proinsulin, c-peptide and insulin in diagnostic suppression test for insulinomas
Diabetologia 13, 571-577 (1977)

73. WILLIAMS, F. G., G. BAUER, E. BAUER
Evidence that somatostatin inhibits proinsulin synthesis and insulin release by isolated pancreatic islets of the rat
Metabolism 29, No 4 (1980)

Herrn Professor Dr. R. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit.
Herrn Professor Dr. E. Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferates.
Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Landgraf-Leurs für die großzügige Unterstützung und die stets konstruktive Kritik bei der Entstehung dieser Arbeit.
Für die stets freundliche und entgegenkommende Zusammenarbeit gebührt Frau Sieber großer Dank.
Herrn Dipl. Mathem. M. Bauer und Herrn König danke ich für die Auswertung der Radioimmunoassays und die statistischen Berechnungen, Fräulein F. Haag für die photographischen Arbeiten.

LEBENSLAUF

Michael Martin Stegherr, geb. 30. Dezember 1950 in Glött

Eltern: Martin Stegherr, Landwirt, und dessen Ehefrau Dorothea, geb. Baschenegger

1956 Eintritt in die Grundschule in Glött

1962 Übertritt in das Johann Michael Sailer-Gymnasium Dillingen (Donau)

1971 Abitur, Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

1978 Abschluß des Medizinstudiums mit der III. Ärztlichen Prüfung am 8.5.1978 in München
Approbation als Arzt am 19.5.1978 in München
Eintritt in die Bundeswehr zur Ableistung des Grundwehrdienstes am 1.6.1978
Tätigkeit als Truppenarzt in Freising, Lechfeld und Rottenburg/Laber

1979 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Lauingen (Donau) am 1.9.1979, zunächst in der chirurgischen Abteilung

1980 am 1.10.1980 Übertritt in die Innere Abteilung des Kreiskrankenhauses Lauingen (Donau)

1981 ab 1.10.1981 Vertretung von Dr. Henkel in dessen Praxis in Aislingen

1982 am 1.4.1982 Niederlassung als praktischer Arzt in Aislingen